



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

SISTEMÁTICA Y VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS ACOILES DEL COMPLEJO
PROCAMBARUS (AUSTROCAMBARUS) MIRANDAI

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

EDUARDO TORRES TORRES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FERNÁNDO ÁLVAREZ NOGUERA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DRA. VIRGINIA LEÓN REGAGNON
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. FRANCISCO JAVIER VEGA VERA
INSTITUTO DE GEOLOGÍA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de junio de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **TORRES TORRES EDUARDO** con número de cuenta **301139159** con la tesis titulada "**Sistemática y variación genética de los acociles del complejo *Procambarus (Austrocambarus) miranda***", realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO ÁLVAREZ NOGUERA**:

Presidente: DRA. GUILLERMINA ALCARÁZ ZUBELDÍA
Vocal: DRA. ALEJANDRA VÁZQUEZ LOBO YURÉN
Secretario: DR. FRANCISCO JAVIER VEGA VERA
Suplente: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Suplente: M. EN C. LAURA MARGARITA MÁRQUEZ VALDELAMAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de septiembre de 2014.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme pertenecer a un programa de excelencia y por todos los conocimientos que me brindaron.

A CONACyT por la beca otorgada durante dos años para realizar mis estudios de maestría, numero de becario 255113. También por la Beca de Inversión en el Conocimiento 2012 – marzo 2013 en el Programa de becas mixta al extranjero para la estancia de investigación en la Universidad Brigham Young University, Provo, UT 84602, USA.

El presente estudio fue financiado por el programa PAPIIT-DGAPA-UNAM con el proyecto IN214910-3 “Sistemática, distribución y conservación de los acociles (*Crustacea: Cambaridae*) de México”. Responsable Dr. Fernando Álvarez.

A los apoyos financieros PAEP para la estancia de investigación en la Universidad Brigham Young University y el congreso “VIII Reunión Nacional Alejandro Villalobos” Puerto Ángel, Oax. Méx.

Al comité tutorial por todos los consejos y el apoyo brindado durante integrado por:

Dr. Fernando Álvarez Noguera

Dra. Virginia León Regagnon

Dr. Francisco Javier Vega Vera

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque en todos estos años me ha permitido desarrollar en mi persona todas las habilidades, tanto intelectuales como físicas, con las que hoy cuento. Por el espíritu de triunfo y trabajo que en mi ha imprimido.

Al Instituto de Biología que me permitió desarrollar a plenitud mi estudio de maestría en sus aulas y con sus excelentes profesores.

A mi tutor el Dr. Fernando Álvarez Noguera por todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi formación académica, sus consejos, gran amistad y confianza. De usted he aprendido más que cuestiones académicas – “una manera de pensar y actuar”

A mis sinodales: Dra. Alejandra Vázquez Lobo, Dr. José Martín García, Dra. Guillermina Alcaráz, Dr. Francisco J. Vega y la M. en C. Laura M. Márquez por su asesoría y consejos.

Al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud y a la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar por su asesoría, amistad y obtención de las secuencias de este trabajo.

Al Laboratorio de Microscopía y Fotografía Científica de la Biodiversidad I y a la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias por ayudar en la obtención de fotografías de microscopía electrónica.

Al Dr. José Luis Villalobos por ser una parte fundamental en la Colección Nacional de Crustáceos, por su asesoría en el tratamiento morfológico y de localidades durante el desarrollo de esta tesis y por su gran amistad.

A mis abuelitos Felita y Benito quienes desde el inicio de mis estudios, y de mi vida, siempre me han ofrecido todo su apoyo y cariño.

A mis tías Licha, Tere, José, Lupita y Lety por el apoyo que han brindado a mi familia en todo momento. A todos mis primos y sobrinos que siempre han estado ahí para darme algún consejo.

A mi amiga Gema por la compañía que me ha brindado durante mi estancia en la Colección Nacional de Crustáceos. Por los consejos y asesorías, y por hacer más ligeros y alegres los días en CU.

A mis amigos Tania Jasso y Felipe Rincón por todas esas largas sesiones de pláticas y café, por estar conmigo en las ferias científicas, exposiciones, talleres, pláticas y muchas de las actividades extra que hacen de nosotros unas excelentes personas. En pocas palabras, por acompañarme a conocer el Universo y más...

A mis compañeros Liliana Toledano, Teresa Naranjo, Lulú Reséndiz, Víctor Soto y Luis Linares, quienes me han brindado su amistad incondicional. Por todos los consejos y asesoría que me ha ofrecido.

A mis alumnos e integrantes de la Banda Juvenil de Marcha Lobos Coacalco por soportar todas mis locuras y permitir expresar mis cualidades artísticas. Por confiar en mi.

DEDICATORIA

A mis padres

Con todo mi cariño dedico esta tesis a mis padres Juana María Torres y Eduardo Torres por hacer de mí una persona trabajadora e impetuosa, que lucha y se esfuerza por alcanzar lo que quiere. Por todo lo que me han enseñado y por apoyarme en todos los momentos de mi vida, darme consejos y escucharme. Por darme la fuerza, alegría y confianza de cada día para que hoy finalice este proyecto tan importante.

A mi hermano

Carlos Eduardo Torres por permitirme luchar a tu lado por alcanzar los propósitos comunes que nos han permitido ser el orgullo de nuestros padres. Por que ser mi compañía y soporte en muchos de los proyectos que he emprendido y hacer buena dupla en todas las locuras que aun se nos ocurren. Como alguna vez te dije, en ocasiones eres más de lo que yo podría ser y eso me ayuda a pensar y mirar hacia adelante. Gracias por todo hermano.

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Acociles en Chiapas.....	5
Estudios moleculares.....	6
Antecedentes.....	8
Objetivo.....	12
General.....	12
Particular.....	12
Materiales y métodos.....	13
Área de estudio y trabajo de campo.....	13
Trabajo de laboratorio.....	13
Análisis de las secuencias de ADN.....	16
Revisión morfológica.....	17
Resultados.....	19
Análisis filogenético.....	19
Variación genética y tiempos de divergencia.....	25
Distribución.....	28
Morfología.....	31
Discusión.....	34
Variación genética y tiempo de divergencia.....	34
¿Constituye <i>Procambarus (A.) mirandai</i> un complejo de especies?.....	37
Conclusiones.....	40
Literatura citada.....	41
Apéndices 1A.....	47
Apéndices 1B.....	51
Apéndices 2.....	54
Apéndices 3.....	55

RESUMEN

Las poblaciones naturales presentan grandes diferencias en cuanto a su tamaño, estructura y dinámica. Dentro de una especie, la dinámica que presentan sus poblaciones es de particular interés cuando se sospecha la presencia de especies crípticas o de un complejo de especies. En los cuerpos de agua continentales de México el género *Procambarus*, de la familia Cambaridae, es el más diverso con 45 especies descritas. En Chiapas se han reconocido hasta el momento tres especies del subgénero *Procambarus* (*Austrocambarus*). En los últimos años, se han recolectado individuos de poblaciones a través del estado de Chiapas de formas que resultan muy parecidas a *P. (A.) mirandai* pero con ligeras variaciones fenotípicas. Dado que varias de estas poblaciones se encuentran en distintas cuencas hidrológicas, se presenta un patrón que describe un complejo de especies que hasta el momento no han sido diferenciadas con los caracteres morfológicos tradicionales. Se desarrolló un análisis para reconocer la variación genética entre poblaciones y se relacionó con los procesos que han llevado a su distribución actual. Se obtuvieron secuencias parciales de dos genes mitocondriales (16S ADNr y la citocromo oxidasa I) y de un gen nuclear (28S ADNr) de 60 acociles de 19 poblaciones dando un total de 1,683 caracteres. Se llevó a cabo un análisis filogenético utilizando los métodos de ML y MB. Los árboles muestran seis grupos de acociles diferentes a las especies reconocidas en el estado (*P. mirandai*, *P. sbordonii* y *P. llamasi*). La distancia genética del gen COI va desde $p = 0$ hasta 0.087. El G2 distribuido en tributarios del río La Venta, podría ser un linaje cuya divergencia es reciente. Los linajes G4 y G5 se distribuyen al centro sur del estado, pueden corresponder a especies no descritas. En su mayoría los análisis filogenéticos, la distribución geográfica y los caracteres morfológicos muestran consistencia en cuanto a la definición de los grupos. Los tiempos de divergencia entre secuencias sugieren un periodo de diversificación durante el Mioceno tardío-Plioceno, etapas en las que la orografía de Chiapas sufrió algunas modificaciones que pudieron generar la diversificación. Este estudio proporciona una primera aproximación a la solución de las especies crípticas y para su posterior descripción.

ABSTRACT

Natural populations exhibit large variations in their size, structure and dynamics. Within a species, some population attributes are of particular interest when the presence of cryptic species or a species complex is suspected. Among the freshwater decapods of Mexico the crayfish of the genus *Procambarus*, family Cambaridae, compose one of the largest groups with 45 species. In Chiapas, three species of *Procambarus* (*Austrocambarus*) have been recognized so far. In recent years, a number of samples have been collected throughout Chiapas of similar forms to *P. (A.) mirandai*. Since several of these populations occur in different hidrological basins, we encounter a pattern that appears to be a complex of species that can not be differentiated using conventional morphological characters. A genetic analysis was conducted to examine the variation among populations and to explore the processes that have led to its current distribution. We used sequence data from two mitochondrial (16S rDNA and cytochrome oxidase I) and one nuclear (28S rDNA) genes from 60 crayfish belonging to 19 populations giving a total of 1,683 characters. Phylogenetic analysis using ML and MB inference was conducted. The trees show six groups separate from the known species recognized in the region (*P. mirandai*, *P. sbordonii*, *P. llamasi*). The genetic distance of the COI gene goes from $p = 0$ to 0.087. The G2 distributed in tributaries of the river La Venta, could be a lineage whose divergence is recent. The G4 and G5 distributed downstate center may correspond to new species. In most phylogenetic analyzes, geographical distribution and morphological characters are consistent in terms of the definition of the groups. The sequence divergence times suggest a period of diversification during late Miocene-Pliocene when Chiapas orography suffered some modifications that could generate diversification. The study presented here offers a first approach to the solution of the cryptic species and its future description.

INTRODUCCIÓN

Las poblaciones naturales de organismos vivos exhiben grandes variaciones en cuanto a su tamaño, estructura y dinámica. Dentro de una especie, la dinámica que presentan sus poblaciones es de particular interés cuando se sospecha la presencia de especies crípticas o de un complejo de especies, es decir, que a pesar de ligeros cambios en el ambiente o de un amplio rango de distribución, no existen diferencias en la morfología de los individuos (Beebee y Rowe, 2004). Las especies son actualmente el punto central de muchas aproximaciones en biología, como estudios en biodiversidad, sistemática, ecología y conservación. Por ejemplo, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) elaboró una Lista Roja de especies amenazadas o en peligro en el 2011, la cual, en ocasiones, es utilizada para definir “hot spots” en los esfuerzos dirigidos a la conservación regional y global. Dada la gran importancia que se le da a las especies, resulta crítico evaluar la validez de estas entidades taxonómicas, a partir de una variedad de datos ecológicos, morfológicos y moleculares (Crandall *et al.*, 2009).

Los crustáceos decápodos dulceacuícolas integran un grupo que se distingue por la heterogeneidad de sus formas y la variedad de ambientes que ocupan. Para México se han descrito hasta el momento 168 especies ubicadas en tres infraórdenes (Caridea, Astacidea y Brachyura) y ocho familias (Alpheidae, Atyidae, Parastacidae, Cambaridae, Palaemonidae, Glyptograpsidae, Pseudothelphusidae y Trichodactylidae). Un alto porcentaje de las 168 especies de crustáceos decápodos dulceacuícolas (85%) son endémicas de México (Rosas, 2012). En particular la familia Cambaridae, con más de 350 especies en Norteamérica, es un grupo antiguo de gran importancia ecológica, comercial y sistemática pues ha servido para explorar hipótesis sobre la evolución geológica y biológica de Norteamérica. La familia Cambaridae junto con la familia Astacidae integran los crustáceos decápodos que comúnmente se conocen como “crayfish” en Canadá y Estados Unidos y “acociles” en México (Villalobos, 1955; Hobbs, 1972b). Los acociles constituyen un grupo importante de invertebrados de agua dulce, en áreas templadas y tropicales del mundo (Fig. 1a).

Dentro de la familia Cambaridae destaca el género *Procambarus* por el número de especies descritas (176) y por su distribución en el continente americano, pues se extiende desde el sur de Nueva Inglaterra a Honduras, encontrándose también en la isla de Cuba y la isla de Pinos (Fetzner, 2008). En los cuerpos de agua continentales de México, las 57 especies de la familia Cambaridae se encuentran organizadas de la

siguiente forma: 46 se ubican en el género *Procambarus*, una en *Orconectes* y 10 en *Cambarellus* (Rosas, 2012). Las especies del género *Procambarus*, a su vez están agrupadas en 9 subgéneros. En el sur de México el subgénero *Procambarus* (*Austrocambarus*) cuenta con 17 especies descritas que se distribuyen desde el centro de Veracruz y norte de Oaxaca, hasta el sur de Tabasco y Chiapas, así como en los tres estados de la península de Yucatán (Álvarez *et al.*, 2007).

ACOCILES EN CHIAPAS

Aunque históricamente un enfoque morfológico ha resuelto razonablemente las relaciones filogenéticas entre niveles taxonómicos superiores dentro de los acociles, existen problemas en la delimitación a nivel de género y especie. Mucha de la incertidumbre de las relaciones de parentesco entre los acociles está causada por el alto grado de conservación de algunos caracteres morfológicos, una alta diversidad intraespecífica y una convergencia entre caracteres a través de hábitats diversos (Johnson *et al.*, 2011).

México posee una enorme diversidad de paisajes compuestos de una gran variedad de ecosistemas y especies de flora y fauna. El estado de Chiapas representa una de las entidades de nuestro país con mayor riqueza biológica y paleontológica (Álvarez, 2011). Al ser convergencia de diversas provincias faunísticas y florísticas a lo largo del tiempo, Chiapas cuenta con un amplio potencial para realizar investigaciones que incluyen la descripción de nuevos taxa (Aguilar, 2011; García *et al.*, 2011; Villalobos y Álvarez, 2013). Con respecto a su historia geológica, el estado muestra una predominancia de ambientes marinos desde el Paleozoico hasta el Mioceno. En Chiapas se han reconocido hasta ahora tres especies de acociles del subgénero *Procambarus* (*Austrocambarus*): *P. (A.) sbordonii* que solamente se encuentra en una cueva en las cercanías de Bochil, *P. (A.) pilosimanus* que tiene presuntamente una amplia distribución en Chiapas y Guatemala y *P. (A.) mirandai* que es una especie común en la depresión central del estado. Sin embargo, durante los últimos años se han capturado ejemplares de por lo menos 15 poblaciones a través de Chiapas de formas que resultan muy parecidas a *P. (A.) mirandai* (Fig. 1b), pero con ligeras variaciones morfológicas.

Procambarus (Austrocambarus) mirandai Villalobos, 1954, presenta las siguientes características diagnósticas. Caparazón sin espina lateral y una sola espina branquiostegal en cada lado. Rostro con el dorso ligeramente acanalado, margen lateral con estructuras angulares en lugar de espinas. Porción anterior del telson con tres

espinas en cada ángulo laterodistal. Macho forma I, con las quelas del primer par de pereiópodos esbeltas y largas; primer par de pleópodos con el proceso mesial espiniforme, recurvado e inclinado lateralmente, hombro cefálico bien desarrollado (Fig. 2). *Annulus ventralis* tuberculiforme y hendido en su porción cefálica (Villalobos, 1954).

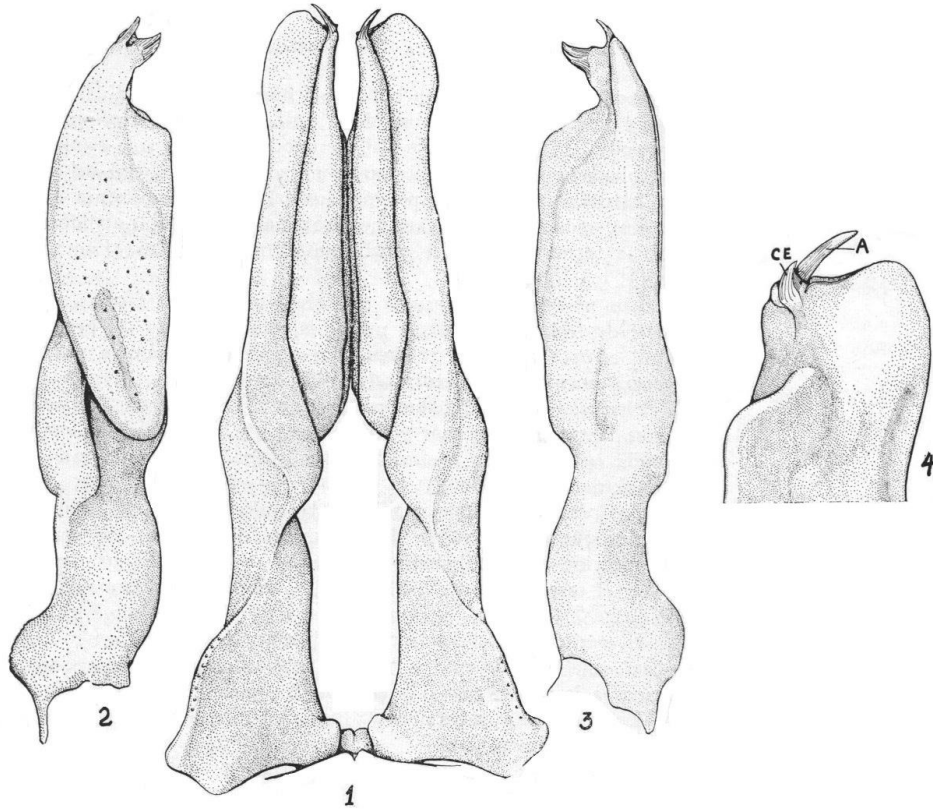


Figura 2. *Procambarus (Austrocambarus) mirandai* macho de la forma I. 1, vista caudal de los pleópodos del primer par; 2, vista mesial; 3, vista lateral; 4, vista cefálica de la región apical. Tomado de Villalobos, 1954.

ESTUDIOS MOLECULARES

Debido a que la mayoría de las especies de acociles presentan números poblacionales bajos, rangos geográficos de distribución pequeños y una pérdida del hábitat significativa, sus poblaciones continuamente se encuentran en riesgo, por lo cual se han destinado recursos y mayor atención para su estudio. Los acociles fueron reconocidos como modelo biológico importante desde la publicación de Huxley (1880) *The Crayfish*. Investigaciones sobre visión (Wald, 1967), fisiología neural (Edwards *et al.*, 1999), evolución molecular (Crandall y Cronin, 1997) y ecología (Garvey *et al.*, 1994), pero es reciente que estos organismos estén bajo la lupa, ahora desde una perspectiva genética. La morfología ha sido una herramienta importante para investigar

la historia evolutiva, sin embargo ésta se hace compleja debido a que muchos caracteres presentan plasticidad o convergencia. Nuestro entendimiento de la filogenia de los acociles puede ser mejorado con la incorporación de análisis de datos genéticos en la reconstrucción de las relaciones de parentesco entre especies (Johnson *et al.*, 2011).

Comprender el nivel de variación genética dentro y entre las especies es importante para muchos estudios astacológicos, incluidos: biología de la conservación, acuicultura, sistemática y genética de poblaciones. Las sustituciones nucleotídicas son utilizadas, cada vez más, como caracteres clave en estudios de sistemática que resuelven la relación entre especies y entre niveles taxonómicos superiores. En este sentido, las secuencias de ADN son especialmente usadas para grupos taxonómicos con pocos caracteres morfológicos variables (Crandall, 1997).

En animales, los genes mitocondriales ribosomales 12S y 16S, y genes codificantes como el citocromo oxidasa subunidad I (COI), han sido utilizados comúnmente como marcadores moleculares en estudios de genética de poblaciones y sistemática (Chu *et al.*, 2009). Además de contar con un número alto de copias que facilitan su amplificación, existen otras ventajas en el uso de estos marcadores mitocondriales: el polimorfismo en sus nucleótidos es neutral, por lo que la distribución de haplotipos es influenciada más por eventos demográficos en la historia de la población que por selección; el tamaño efectivo de la población en el ADNmt es de un cuarto del de los genes nucleares diploides, por lo que la frecuencia de haplotipos puede derivar rápidamente, creando diferencias genéticas entre poblaciones en relativamente poco tiempo; finalmente, debido a que no hay recombinación entre las moléculas del ADNmt de animales, cada haplotipo uniparental heredado tiene sólo un ancestro en la generación previa, con lo que se facilita el análisis de las relaciones genéticas (Beebee y Rowe, 2004).

Los genes nucleares presentan una coalescencia más lenta que los genes mitocondriales, lo cual permite tener una mejor resolución en los nodos filogenéticos profundos. El uso de genes nucleares, sumados a los genes mitocondriales, permite tener un amplio número de marcadores independientes en el conjunto de datos. Por otro lado, es importante considerar que los genes nucleares pueden presentar familias génicas o pseudogenes, lo cual complica su amplificación. Los genes ribosomales 18S y 28S, han sido ampliamente utilizados para la sistemática de decápodos. Las tasas de mutación varían entre y dentro de estos genes, lo que permite que se usen como

instrumentos filogenéticos valiosos aplicables en diferentes niveles taxonómicos (Toon *et al.*, 2009).

Finalmente, un sistema ideal de estudio cabría en poblaciones de una especie con distribución amplia o fragmentada que permitiera observar los procesos históricos que dieron origen a dicha distribución. Lo anterior sumado a la posible presencia de un complejo de especies, genera un interés particular sobre la composición genética de las poblaciones.

Ya que varias de las poblaciones de *P. (A.) mirandai* en Chiapas se encuentran en diferentes cuencas hidrológicas aisladas geográficamente, se presenta un patrón que describe un complejo de especies que no pueden ser diferenciadas con los caracteres morfológicos usuales (primer pleópodo del macho forma I). De esta manera, se planteó realizar un análisis de variación genética utilizando secuencias de tres genes, dos de ellos mitocondriales y uno nuclear, de modo que los resultados sean la base para reconocer la presencia de especies nuevas y puedan ser utilizados para fechar eventos relevantes en la evolución de este complejo de especies en Chiapas.

ANTECEDENTES

Los trabajos sobre acociles en el país iniciaron desde el siglo XIX con publicaciones de investigadores europeos (Erichson, 1846). A partir de entonces se realizaron publicaciones (Ortmann, 1905a; b; Hobbs, 1942; Villalobos, 1955) que dieron cuenta de la gran diversidad de cambáridos con que cuenta el país. Los cambáridos son habitantes comunes de gran parte de los arroyos y depósitos lacustres desde la bahía de Hudson en el sur de Canadá hasta Honduras y Cuba (Villalobos, 1955). En la Tabla 1 están organizadas las publicaciones que reportan acociles cuya área distribución es el estado de Chiapas.

En función del nivel taxonómico, así como del objetivo del trabajo, se han utilizado diferentes marcadores genéticos. A continuación se hace referencia a algunos estudios relevantes sobre variación genética en acociles y otros crustáceos.

A pesar de que los acociles han funcionado como modelo biológico para diversos estudios, las hipótesis de encestaría común no estaban claras. Crandall *et al.* (2000) utilizaron secuencias de las regiones 18S ADNr, 28S ADNr y 16S ADNmt para inferir las relaciones filogenéticas entre las familias Astacidae, Cambaridae y Parastacidae que comprenden a los acociles. En este estudio se confirma la hipótesis sobre el origen monofilético de las tres familias propuesto anteriormente con base en

Tabla 1. Lista de publicaciones donde se han reportado acociles cuya área de distribución es el estado de Chiapas.

	<i>P. (A.) acanthophorus</i>	<i>P. (A.) llamasi</i>	<i>P. (A.) mirandai</i>	<i>P. (A.) pilosimanus</i>	<i>P. (A.) sbordonii</i>	<i>P. (S.) clarkii</i>
Hobbs Jr., 1972		•	•	•		
Hobbs Jr., 1989	•	•	•	•	•	
López, 2008	•		•	•	•	
Álvarez, <i>et al.</i> 2011		•	•	•	•	•

caracteres morfológicos. En sus resultados se agrupa al género *Cambaroides* en la familia Astacidae y no en la Cambaridae donde comúnmente se ubicaba. Además apuntan, que el fuerte soporte del origen monofilético y la distribución geográfica del grupo, sugiere el origen de los acociles en la Pangea durante el Periodo Triásico (185-225 millones de años atrás) y que la separación de las dos superfamilias está dada por la división de la Pangea en Laurasia y Gondwana.

Taylor y Hardman (2002) obtuvieron secuencias del gen mitocondrial COI con el propósito de establecer relaciones filogenéticas entre acociles en el subgénero *Crockerinus*, del género *Orconectes*. Los análisis filogenéticos se realizaron con criterios de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) obteniendo dendrogramas que no apoyan la monofilia del subgénero; sin embargo, sustentan parcialmente la clasificación basada en la morfología del primer pleópodo del macho. Los mismos autores demostraron la utilidad del COI para inferir relaciones interespecíficas entre los cambáridos. En otro estudio, Bond-Buckup *et al.* (2010) describieron dos nuevas especies de anomuros de agua dulce: *Aegla pomerana* y *Aegla muelleri* del río Itajaí en Brasil. Ellos utilizaron evidencias morfológicas y moleculares (el gen nuclear 28S, los genes mitocondriales 12S, 16S, COI y COII), con el propósito de distinguir a las especies e inferir sus relaciones filogenéticas, encontrando una cercanía entre *A. pomerana* con *A. leptodactyla* y *A. muelleri* con *A. leptochela*, pese a las diferencias morfológicas muy marcadas.

Buhay y Crandall (2005) utilizaron la región 16S ADNmt para estudiar las relaciones filogenéticas y filogeográficas de los acociles subterráneos del género *Orconectes* en la placa de Cumberland, al sureste de los Estados Unidos. Este género comprende tres especies habitantes de cavernas o estigobíticas: *O. incomptus*, *O. australis* (con dos subespecies *australis* y *packardi*) y *O. sheltage*. A pesar de la

creencia sobre el estado en riesgo de las especies estigobíticas, sus resultados muestran que las especies de acociles subterráneos han alcanzado niveles de diversidad genética que va de moderada a alta, con tamaños poblacionales más altos de lo esperado, además el análisis de clados anidados muestra un extenso flujo génico dentro del sistema kárstico (relieves de carbonato de calcio disueltos por el agua).

Shull *et al.* (2005) utilizaron secuencias de tres regiones de genes mitocondriales (COI, 16S y 12S) y una región nuclear (28S) de 40 especies de acociles espinosos del género *Euastacus* endémico de los ecosistemas de agua dulce de las costas al este de Australia. Por medio de análisis filogenéticos de MP, ML e inferencia Bayesiana (MB), determinaron las relaciones de ancestría descendencia dentro del género. Los resultados sugieren que *Euastacus* es un género monofilético que diversificó a partir de un clado al norte del continente. Con este estudio también apoyan la hipótesis de monofilia de *Euastacus* con su grupo hermano *Astacopsis*, género endémico de Tasmania.

Gurney *et al.* (2006) secuenciaron el gen COI mitocondrial en 17 organismos de la especie *Sacculina carcini*, que parasita tres especies diferentes de portúnidos en diferentes regiones del norte de Europa: *Carcinus maenas*, *Liocarcinus marmoreus* y *L. holsatus*. Debido a que existen pocos caracteres morfológicos en los cuales se pueda basar un análisis taxonómico, los autores utilizaron el COI para advertir que es la misma especie de *S. carcini* la que parasita a los tres hospederos. Por último sugieren que el análisis de las secuencias del gen COI puede ser un método que resuelva problemas sobre filogeografía, genética de poblaciones y taxonomía de los rizocéfalos.

Buhay y Crandall (2008) continuaron con el estudio de los acociles de cavernas del género *Orconectes* en la Placa de Cumberland al sur de los Apalaches, Estados Unidos, esta vez utilizaron tres genes mitocondriales, el 12S, 16S y COI. Describieron una nueva especie, *Orconectes barri*, y elevaron a nivel de especie a la subespecie *O. australis packardi*, además de incluir sus estatus de conservación. Los autores llegan a la conclusión de que usar sólo la morfología del pleópodo del macho forma I no es suficiente para la descripción de estas especies estigobíticas.

Crandall *et al.* (2009) resaltaron la importancia de reconocer los límites entre especies al ser éstas las unidades de conservación. Mencionan que un muestreo geográfico y taxonómico minucioso, sumado a datos de especímenes en museos, permite que las conclusiones taxonómicas y de conservación a las cuales se llegue sean más robustas. Utilizaron secuencias de 16S y 12S ADNmt para revisar, en los Estados Unidos, el estatus del acocil *Procambarus ferrugineus* como especie en peligro,

incluyen también a su especie hermana *Procambarus liberorum*. Los análisis se hicieron con ML, MB y clados anidados. Su conclusión es que ambas especies son la misma, con lo cual el estatus de especie en peligro cambia a estable bajo algunas consideraciones. Adicionalmente en sus muestreos descubren tres nuevas especies crípticas.

Markow y Pfeiler (2010) realizaron un estudio con el isópodo intermareal *Ligia occidentalis* (Ligiidae) que se distribuye desde el estado de Oregón, Estados Unidos hasta la bahía de Chamela en Jalisco, México, incluido todo el Golfo de California. Realizaron análisis de MP y MB con secuencias de COI. Calcularon también la distancia genética utilizando el modelo de Kimura 2 parámetros (K2P) obteniendo distancias que van de 13.2% a 26.7%. Estos valores son similares a las distancias interespecíficas encontradas en crustáceos. Su conclusión es que la estructura poblacional encontrada coincide con sus predicciones, mas no así el grado de diversidad genética global, sugieren que *L. occidentalis* representa un complejo de especies basados en el concepto de especie filogenético según el cual los linajes evolutivos son diagnosticados y definidos como especies distintas basados en la filogenia.

OBJETIVOS

GENERAL

- Explorar la variación genética existente en poblaciones del complejo *Procambarus (Austrocambarus) mirandai* distribuidas en la porción central de Chiapas.

PARTICULARES

- Describir la variación genética de dos genes mitocondriales, 16S ADNr y COI, y un gen nuclear, 28S ADNr, en poblaciones de acociles del estado de Chiapas.
- Relacionar la variación genética que hay entre las poblaciones con su distribución geográfica.
- Relacionar la variación genética con algunos rasgos morfológicos de importancia taxonómica.
- Identificar la posible presencia de especies crípticas dentro del complejo de *P. mirandai* en poblaciones de acociles del estado de Chiapas.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO Y TRABAJO DE CAMPO

El área de estudio comprende la depresión central, la porción norte de la vertiente occidental y la zona de los Lagos de Montebello en el estado de Chiapas, México, donde se estudiaron 20 poblaciones de acociles (Fig. 3). Se realizaron muestreos en cuerpos de agua permanentes o con poco movimiento, preferentemente en las orillas donde abundaba la vegetación ribereña. Los organismos se capturaron manualmente removiendo las rocas o con redes de cuchara, posteriormente fueron preservados con alcohol al 96% (Dessauer *et al.*, 1996) y se depositaron en la Colección Nacional de Crustáceos (CNCR), Instituto de Biología, UNAM (Tabla 2). Para la identificación de los acociles, se utilizaron claves taxonómicas de Hobbs (1972a, 1989) y de Villalobos (1954, 1955).

TRABAJO DE LABORATORIO

El ADN total de los acociles se extrajo con el kit DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN a partir de tejido del abdomen o de las branquias de los organismos. El último paso de este protocolo es resuspender el ADN en 100 μL de agua bidestilada y almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Hillis *et al.*, 1996). Mediante PCR (Saiki *et al.*, 1988) se amplificaron fragmentos de tres genes: el COI (Folmer, 1994), el 16S ribosomal (Crandall y Fitzpatrick, 1996), ambos mitocondriales, y el gen nuclear 28S ribosomal (Whiting *et al.*, 1997) (Tabla 3). Los 15 μL de la reacción de amplificación consisten de: 0.2 μL de cada oligonucleótido, 1.25 μL de buffer, 0.25 μL de dNTP's, 0.5 μL of MgCl_2 , 0.125 μL de polimerasa Taq Platinum Invitrogen, 3 μL de DNA y 9.475 μL de ddH_2O . Las condiciones de la PCR fueron: 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 sec, alineamiento con temperatura según el gen (Tabla 3) por 30 sec y extensión a 72°C por el tiempo particular de cada gen (Tabla 3), seguida de una extensión final a 72°C por 7 min. Se utilizaron geles de agarosa al 1% para correr la electroforesis con buffer TBE a 100V por 20 minutos. Los amplificados de PCR se purificaron con columnas MontageTM PCR de Millipore, siguiendo las especificaciones del fabricante, y posteriormente se realizó la secuenciación cíclica en ambas direcciones. Las reacciones se prepararon con 0.5 μL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 2.1 μL de buffer 5X, 1 μL de primer a $10\mu\text{M}$ y 2 μL del producto purificado. El programa utilizado fue el estándar de BigDye v3.1. Las reacciones de secuencia se purificaron con columnas de Sephadex CentriSep Spin Columns. Los productos fueron procesados en un secuenciador 3500XL de 24 capilares.

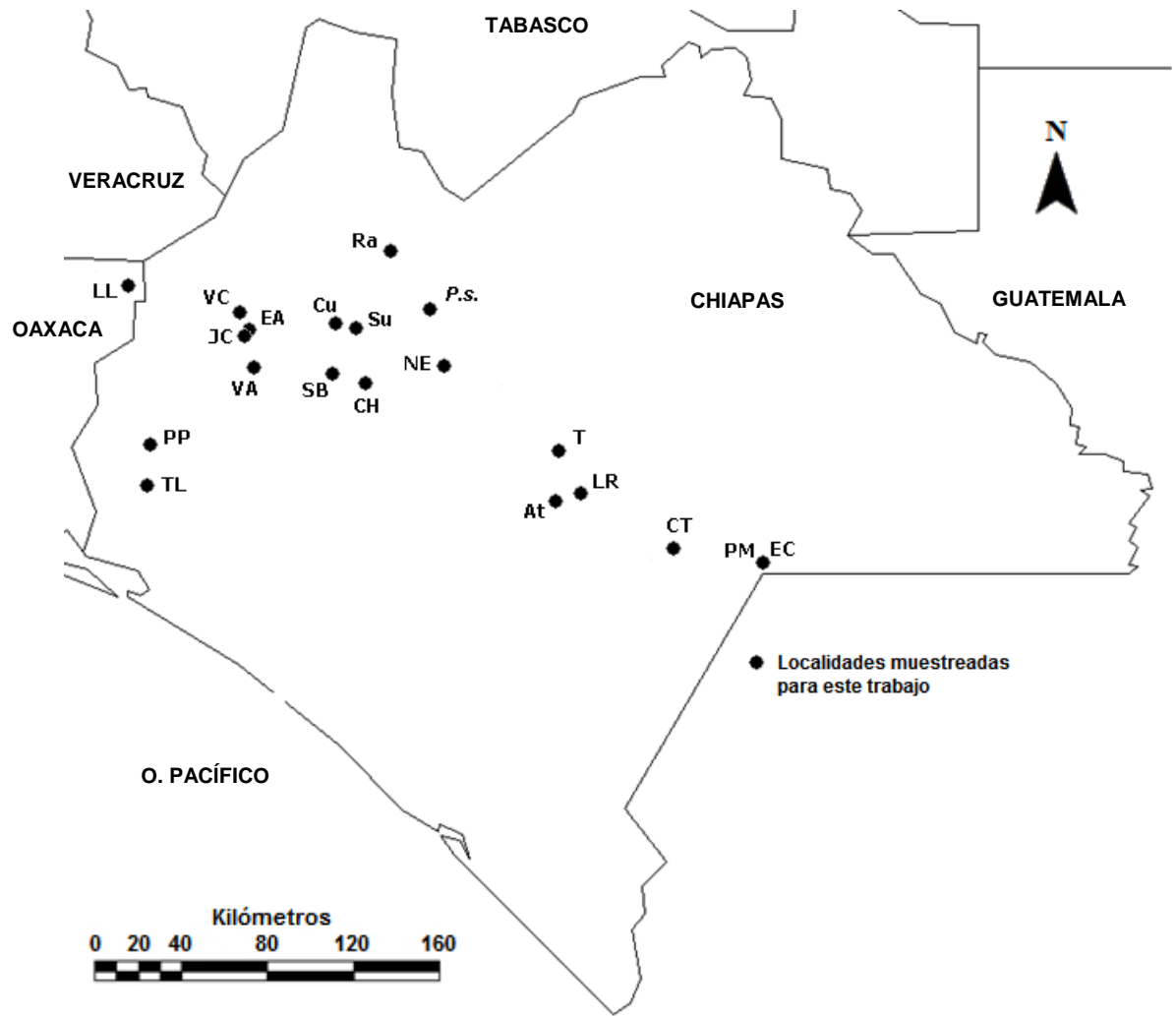


Figura 3. Registros de acociles en el estado de Chiapas depositados en la Colección Nacional de Crustáceos.

Tabla 2. Descripción de las muestras de acociles analizadas: número de catálogo en la CNCR, localidad, abreviatura y georreferencia.

No. CNCR	Localidad	Abreviatura	Latitud (N)	Longitud (W)
25317	Arroyo Palo Pique, Mpio. de Cintalapa	PP	16° 31' 15"	93° 51' 00"
25393	El Sabinal, Pozas de Berriozábal, Mpio. de Tuxtla Gutiérrez	SB	16° 46' 00"	93° 13' 48"
25394	Laguna El Carrizal, Parque Nacional Lagunas de Montebello, Mpio. de La Trinitaria	EC	16° 06' 41"	91° 43' 33"
25395	Arroyo carretera Teopisca-Villa de las Rosas, Mpio. de Villa de las Rosas	T	16° 30' 00"	92° 26' 00"
25396, 25534	Arroyo El Chile, canal carretera Soyatitán-Villa de las Rosas, San Antonio Tzujulá, Mpio. de Las Rosas	At	16° 20' 55"	92° 24' 07"
25397	Charco cerca de la Laguna El Carrizal, en el Parque Nacional de las Lagunas de Montebello, Mpio. de La Trinitaria	PM	16° 06' 37"	91° 43' 38"
25431	Poza de agua carretera Comitán-La Trinitaria, Mpio. de Comitán	CT	16° 09' 24"	92° 04' 48"
25435, 25437	Puente del arroyo Veinte Casas, Reserva de la Biosfera Selva El Ocote, Mpio. de Ocozocuaula	VC	16° 58' 43"	93° 32' 00"
25436, 25439	Río La Venta, El Aguacero, Reserva de la Biosfera Selva El Ocote, Mpio. de Ocozocuaula	VA	16° 47' 26"	93° 29' 20"
25438	Nuevo San Juan Chamula, Reserva de la Biosfera Selva El Ocote, Mpio. de Ocozocuaula	JC	16° 53' 19"	93° 31' 09"
25443	Arroyo Tierra y Libertad, Mpio. de Jiquipilas	TL	16° 22' 45"	93° 51' 35"
25535	Arroyo carretera Villa de las Rosas-Comitán, Mpio. Las Rosas	LR	16° 21' 16"	92° 21' 31"
26195 26741	Sótano de La Lucha Mpio. Ocozocuaula	LL	17° 03' 47"	93° 53' 24"
26565	Arroyo en el poblado de Rayón, Mpio. de Rayón	Ra	17° 11' 36"	93° 00' 45"
26572	Manantial en la granja piscícola "Nuevo Edén", Mpio. de Ixtapa	NE	16° 47' 29"	92° 49' 40"
26742	Arroyo de Cerro Hueco Mpio. Tuxtla Gutiérrez	CH	16° 43' 46"	93° 05' 23"
27365	Sumidero del Higo Ejido Benito Juárez Mpio. San Fernando	Su	16°54'31"	93°11'07"
27366	Cueva de Cuauhtémoc Ejido Cuauhtémoc Mpio. San Fernando	Cu	16°55'42"	93°13'19"
27367	Toma de agua El Aguajón Col. Nuevo San Juan Chamula Mpio. Ocozocuaula	EA	16°54'03"	93°31'0"

Tabla 3. Oligos para tres fragmentos de genes, además el número de pares de base (pb) que amplifican, la temperatura (T °C) de alineamiento en la PCR y el tiempo en la extensión (t).

Gen	Oligo	Secuencia 5' - 3'	pb aprox.	T °C	t
COI mt	LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	700	48	1:30
	HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA			
mt 16S r	1471	CCT GTT TAN CAA AAA CAT	550	47	1:00
	1472	AGA TAG AAA CCA ACC TGG			
n 28S r	28S a	GAC CCG TCT TGA AAC ACG GA	400	56	0:30
	28S b	TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA			

ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADN

Una vez obtenidas las secuencias se visualizaron con el programa Chromas 2 y Sequencher 4.8. Las secuencias amplificadas del gen 16S ADNr se alinearon con el servidor en línea Mafft v6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software>), las secuencias de los otros dos genes se alinearon de forma manual con el programa BioEdit (Hall, 1999). Se utilizó también el programa Mesquite 2.75 (Maddison y Maddison, 2011) para editar las secuencias, identificar si los fragmentos no son pseudogenes y preparar los archivos para los análisis posteriores. Al tener todas las secuencias alineadas, se calculó la diversidad nucleotídica “ π ” con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009), la frecuencia de nucleótidos y las sustituciones por sitio con el programa PAUP v4 (Swofford, 2002). Se identificaron los diferentes haplotipos y se obtuvo la diversidad haplotípica “HD”.

La inferencia filogenética se realizó con máxima verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood*) y probabilidad posterior (MB, *Mr Bayes*). El análisis de ML se utilizó en los genes COI y 16S ADNr y se corrió en el programa PAUP v4 (Swofford, 2002). Se utilizó una búsqueda heurística con un muestreo de ramas de tipo TBR (tree-bisection and reconnection) y un bootstrap de 500 réplicas para el soporte de las ramas. También se hizo este análisis con los tres genes concatenados en el programa RAxML (Stamatakis, 2008).

Para el MB se concatenaron los tres genes. En el programa MrBayes 3.04b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) se utilizó sólo una copia de cada haplotipo y el modelo sugerido por jModelTest (Posada y Crandall, 1998) para cada gen con el criterio de información Bayesiano (BIC). La cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) se corrió 1×10^6 generaciones con 4 cadenas muestreando cada 1,000 generaciones y un burn-in de 400,000 generaciones observado con el programa Tracer v.1.5.0 (Rambaut y

Drummond, 2009). Finalmente en MrBayes se calculó el árbol de consenso del 50%. Los árboles obtenidos fueron visualizados con el programa FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

Se utilizó el programa TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000) y los alineamientos del gen COI para observar las relaciones entre las secuencias variando el número de pasos entre ellas y obtener redes de haplotipos.

Para los análisis filogenéticos se utilizaron como grupo externo secuencias de *Procambarus (Scapulicambarus) clarkii* obtenidas de GenBank número de acceso AY701195 para el gen COI, DQ666844 para el 16S ADNr y EU920970 para el gen 28S ADNr. Se obtuvieron también las secuencias de los tres genes propuestos en este trabajo para el acocil *Procambarus (Austrocambarus) sbordonii*, colectado en la localidad tipo, río Santo Domingo en el municipio de Bochil, Chiapas (16°59'09.40" N, 92° 52' 13" W), número de registro CNCR 26567. Por último se incluyeron secuencias del acocil *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* de la localidad de Cacao, Quintana Roo (18°12'03.3" N, 88°45'17" W) para los genes COI y 28S ADNr y secuencias de GenBank con número de acceso JX127826 para el 16S ADNr.

Para calcular el tiempo de divergencia de los taxones se utilizaron los alineamientos del gen COI. Se calcularon las distancias genéticas promedio de los clados y se utilizaron dos tasas de mutación del COI, la que presentan especies hermanas de camarones chasqueadores del istmo de Panamá *Alpheus* spp. de 1.2% por millón de años (Ketmaier *et al.*, 2003) y la que presentan los cangrejos grápsidos del género *Sesarma* en la isla de Jamaica de 2.3% por millón de años (Schubart *et al.*, 1998a). Con las tasas de mutación se hizo una regla de tres de la siguiente manera: divergencia genética promedio del clado por un millón entre 1.2 para calcular el mayor tiempo de divergencia o 2.3 para el menor tiempo.

REVISIÓN MORFOLÓGICA

Se observaron las espinas laterales y branquiostegales del caparazón con un microscopio estereoscópico (Fig. 4). También se tomaron fotografías con el microscopio electrónico de barrido (MEB), para lo cual se realizaron disecciones del 1er pleópodo del macho forma I. Posteriormente se colocaron en series de alcohol al 70%, 80%, 90% y 100% durante 30 minutos en cada frasco para deshidratarlos. Después se secaron a punto crítico en un secador EMITECH K850, se colocaron en un

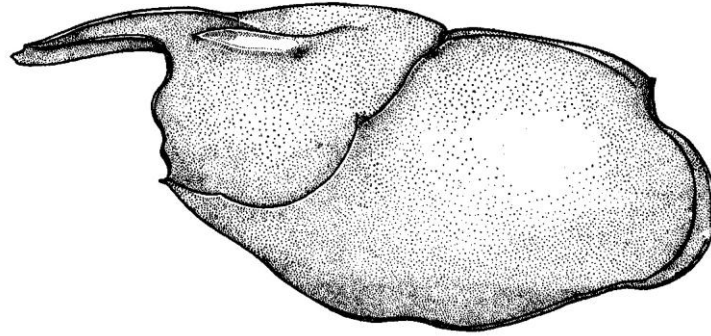


Figura 4. Vista lateral del caparazón de *Procambarus (A.) mirandai*, se observa una espina lateral y ninguna branquiostegal. Tomado de Villalobos, 1954

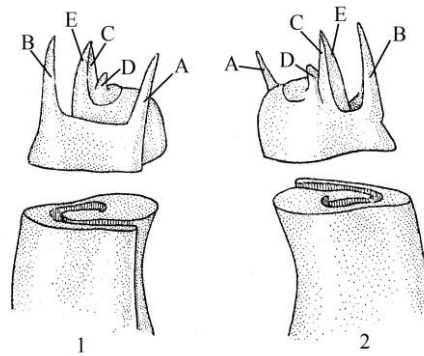


Figura 5. Parte apical del primer pleópodo del macho forma I. A, proceso mesial; B, proceso cefálico; C, proceso centrocaudal; E, proceso centrocefálico; CE, proyección central; D, proceso caudal. Tomado de Villalobos, 1955.

portamuestras de aluminio y se sujetaron con cinta de carbón. Se cubrieron durante 1 minuto con una capa de oro que alcanzó 20 micras de grosor en una evaporadora Quorum Q150RES. Finalmente se tomaron fotografías con el MEB marca Hitachi modelo SU1510. Se obtuvieron 5 vistas de cada pleopodo: mesial, caudal, lateral, cefálica y apical.

Para poder caracterizar el 1er pleópodo del macho forma I en las fotos obtenidas, consideramos que el apéndice es una lámina enrollada en espiral, de fuera hacia dentro primero encontramos el proceso mesial, después el proceso cefálico, enseguida el proceso centrocaudal, después el proceso caudal y por último, en el centro, el proceso centrocefálico (Fig. 5).

RESULTADOS

ANÁLISIS FILOGENÉTICO

En total se incluyen 73 secuencias del gen COI, 66 del 16S ADNr y 65 del 28S ADNr (Apéndice 2). En la genealogía obtenida a partir del COI, con las aproximaciones de ML, se observa, con un gran soporte, 6 grupos diferentes a las 3 especies de acociles utilizadas como grupos externos (*P. sbordonii*, *P. llamasi* y *P. clarkii*) (Fig. 6).

En el árbol se observaron tres grandes linajes, el primero integra a los grupos 1 y 2, el segundo a los grupos 3, 4 y 5 y el tercero al grupo 6. En la parte superior del árbol se encuentran las secuencias de la localidad tipo de *P. (A.) mirandai* (Cerro Hueco) y todas las relacionadas: Nuevo San Juan Chamula, El Aguajón, El Sabinal, Veinte Casas, Cueva de Cuauhtémoc y Sumidero del Higo, a este conjunto se le llamará grupo 1. El grupo 2 lo integran las localidades de: Palo Pique, Tierra y Libertad y Río La Venta. El grupo 3 está conformado por: Nuevo Edén y Rayón. En el grupo 4 se encuentran: Villa de las Rosas y El Chile. El grupo 5 cuenta con: dos puntos en El Carrizal y Comitán-La Trinitaria. Finalmente el grupo 6 sólo tiene las secuencias de la localidad de sótano de La Lucha.

Debido a la gran variación encontrada en el gen 16S ADNr, se presenta también el árbol de ML con este gen (Fig. 7). Se pueden observar los mismos agrupamientos que con el gen COI, con excepción de la relación que hay entre el grupo 4 y 5 (G4 y G5). Con la genealogía del 16S ADNr resultan más cercanamente emparentados el G4 y G5, siendo *P. llamasi* una especie hermana de ambos grupos y con el gen COI *P. llamasi* se presenta como especie hermana del G5 y G4 compartiendo un ancestro común con ambas.

Para el análisis de ML y MB de los tres genes concatenados sólo se tomaron los haplotipos diferentes, 20 en total, con una extensión de 1,685 pb. Con el programa jModelTest (Posada y Crandall, 1998) se buscó el modelo que mejor se ajustaba a las secuencias para definir los parámetros en MB. Los modelos fueron HKY+G para el gen 16S ADNr, HKY para el 28S ADNr y HKY+G para el gen COI. Ambos análisis muestran similitudes en sus agrupamientos, por lo que sólo se muestra el árbol obtenido con ML y el programa RAxML (Fig. 8).

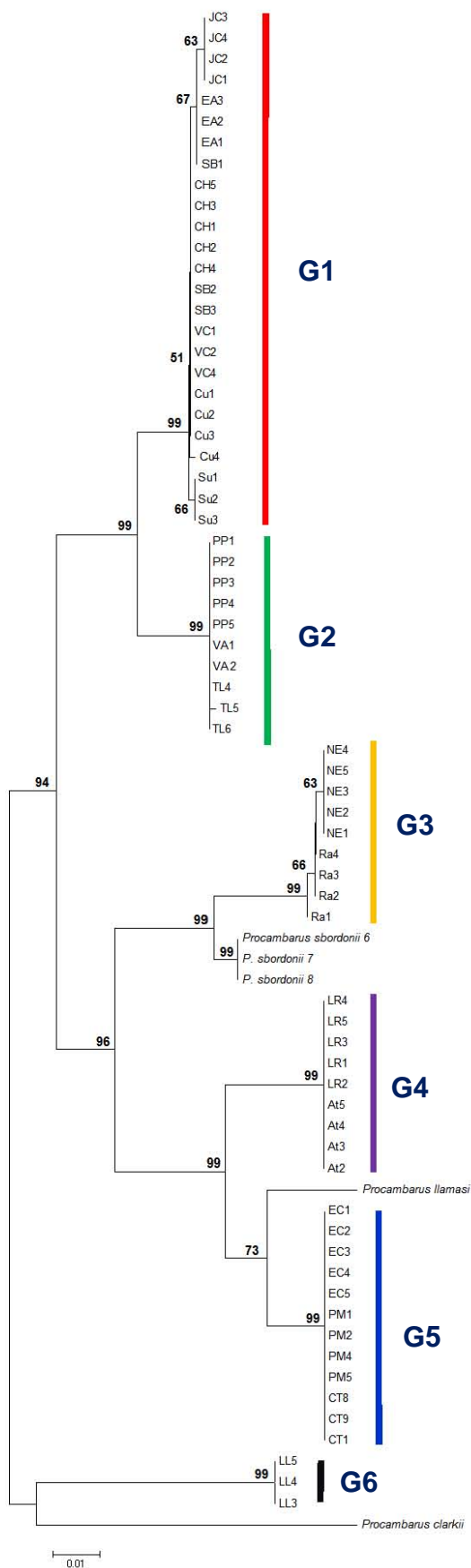


Figura 6. Árbol del gen COI inferido con el método de ML de 72 secuencias con distribución y grupo externo, basado en el modelo nucleotídico: GTR+G. Valores de *bootstrap* en la parte superior de las ramas. Las abreviaciones de las localidades están referidas en la Tabla 2.

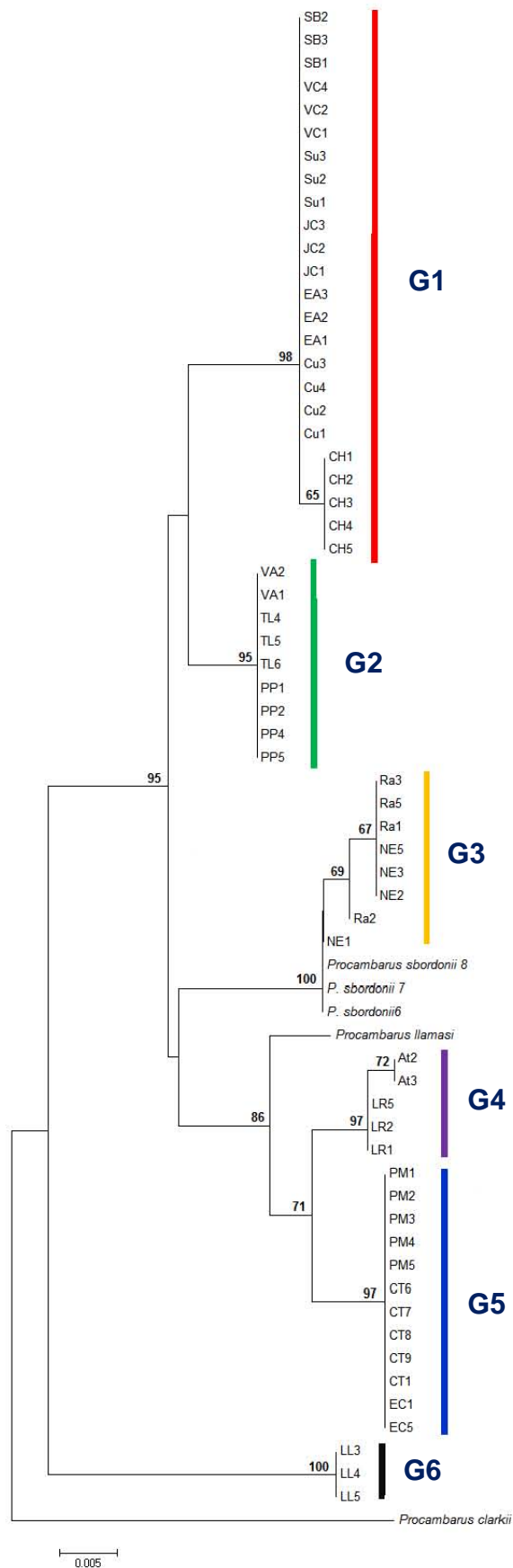


Figura 7. Árbol del gen 16S ADNr inferido con el método de ML de 65 secuencias con distribución y grupo externo, basado en el modelo nucleotídico: GTR+G. Valores de *bootstrap* en la parte superior de las ramas. Las abreviaciones de las localidades están referidas en la Tabla 2.

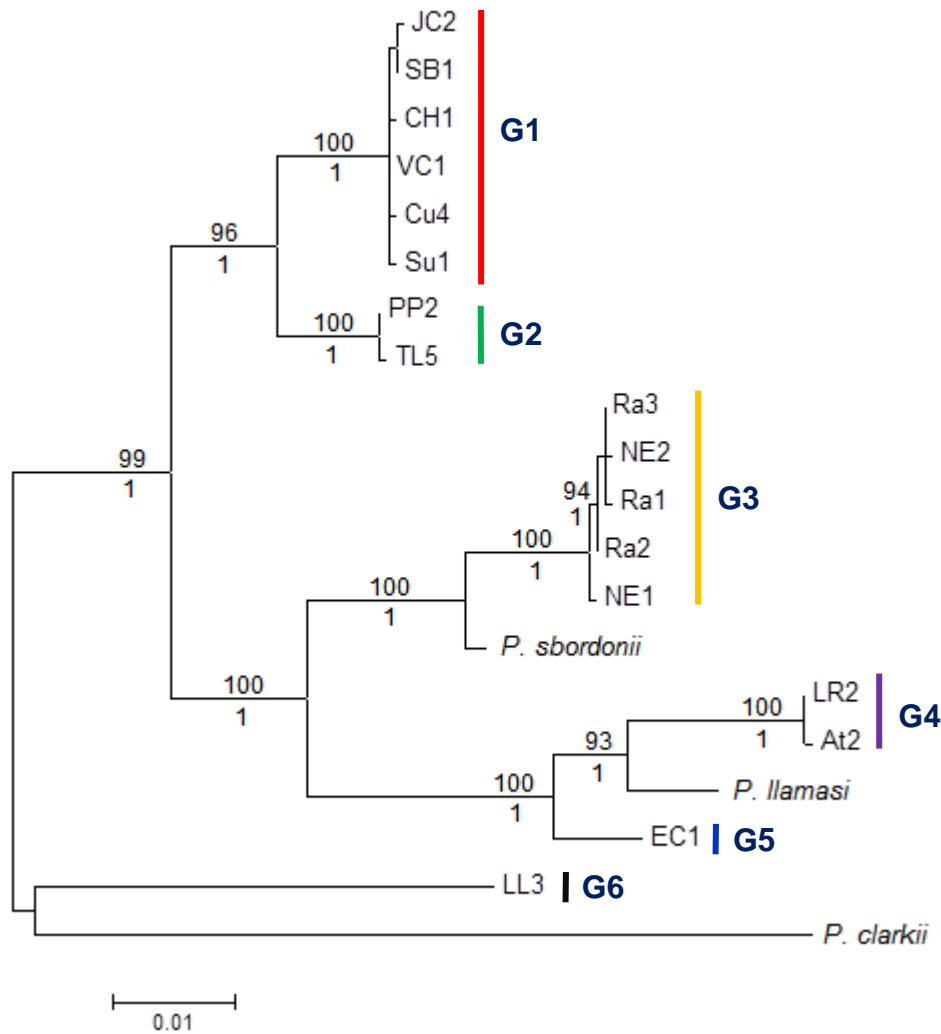


Figura 8. Análisis de ML con 20 haplotipos de los 3 genes concatenados, estructura igual con MrBayes. Valores de *bootstrap* sobre las ramas y de probabilidad posterior debajo de ellas. Las abreviaciones de las localidades están referidas en la Tabla 2.

En la red de haplotipos del gen COI se agruparon las secuencias con un parentesco del 98% (Fig. 9). Las agrupaciones no se contraponen a la genealogía mostrada con este gen. La figura además, muestra con cuadros de colores los grupos que se señalan en las genealogías. El programa TCS permite modificar la cantidad de pasos mutacionales o el porcentaje de similitud para realizar el análisis, en este sentido las agrupaciones que hace iguales al análisis filogenético se mantienen hasta con 91% de similitud o 15 pasos mutacionales. Al agregar pasos y disminuir el porcentaje de similitud algunos grupos empiezan a unirse: 16 pasos se une *P. sb* con Ra1 (recuadro amarillo), con 17 pasos CH y PP se unen (recuadro rojo y verde) y con 20 pasos se conectan EC (recuadro azul) y *P. ll*. La red completa se obtiene a los 63 pasos mutacionales (Fig. 10).

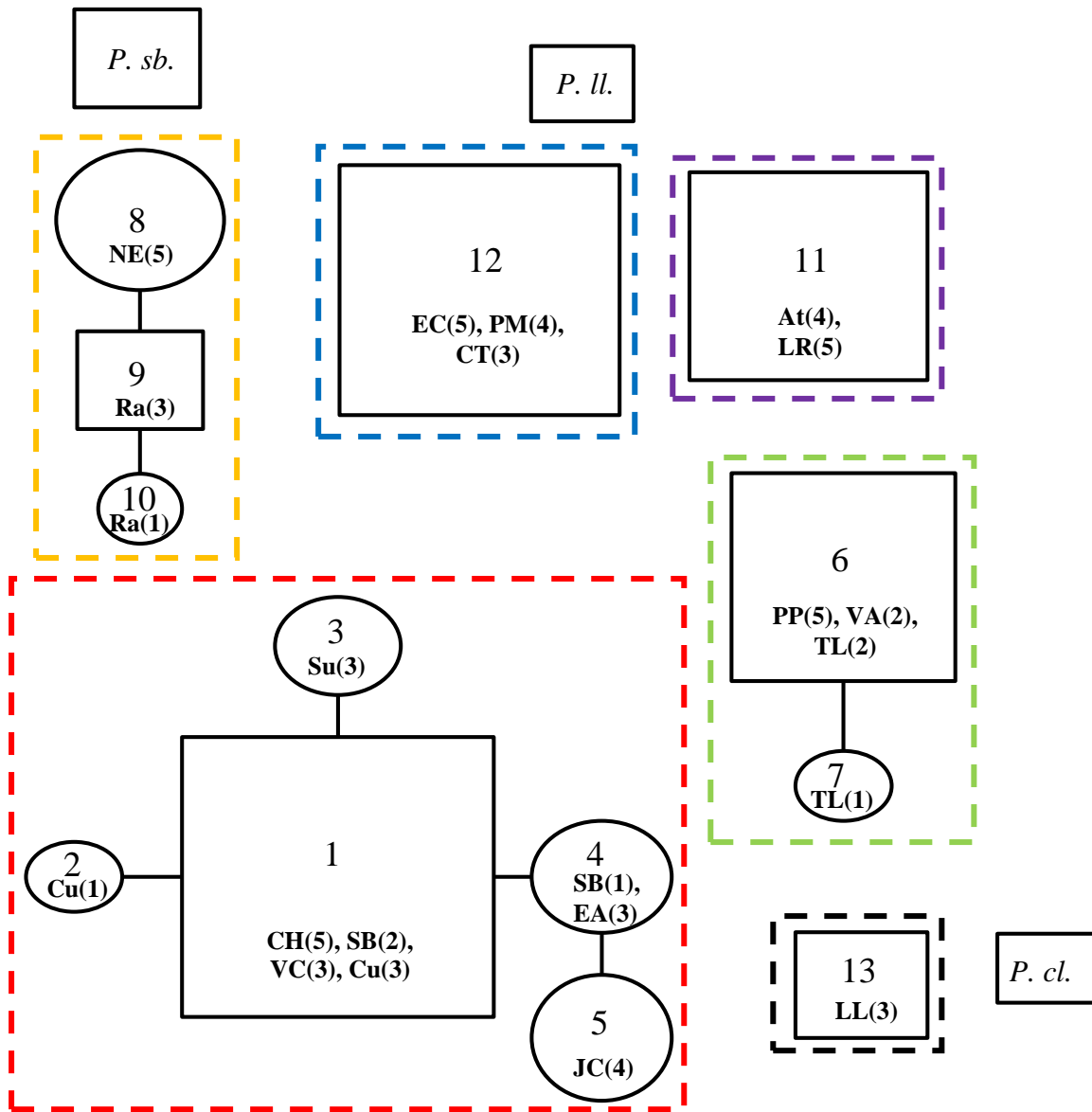


Figura 9. Red de haplotipos del programa TCS con el gen COI, agrupamiento del 98% de similitud. Los cuadros en colores y punteados refieren a los clados de las genealogías. Los números en la parte central de cuadros y óvalos indican el número consecutivo que corresponde a cada haplotipo. Las localidades donde se encuentra el haplotipo están en negritas y se enlistan en la Tabla 2. El número entre paréntesis es la frecuencia.

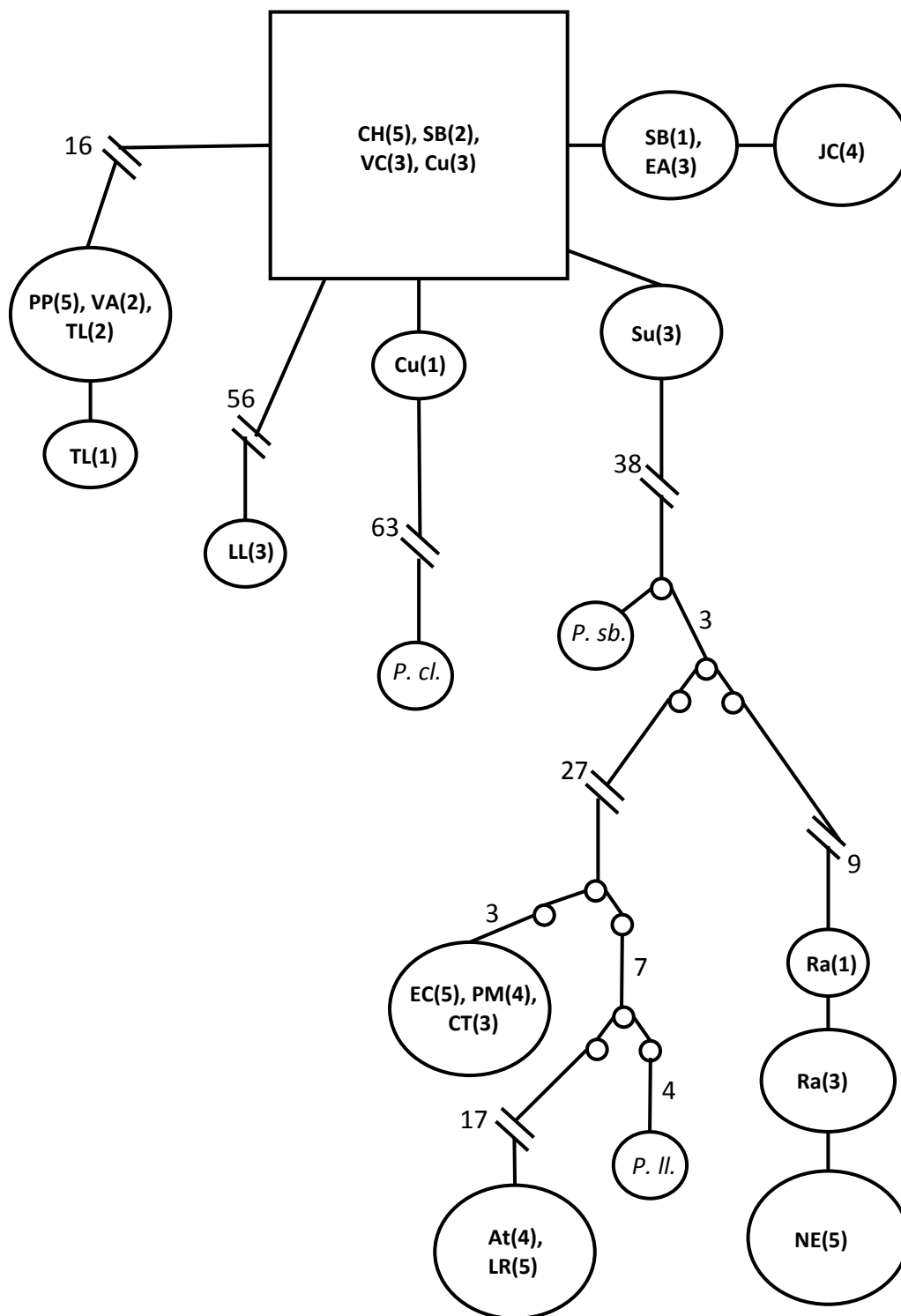


Figura 10. Red de haplotipos del programa TCS con el gen COI, conexión de 63 pasos mutacionales. Las localidades donde se encuentra el haplotipo están en negritas y se enlistan en la Tabla 2. El número entre paréntesis es la frecuencia.

A continuación se describe la variación genética de cada gen al interior de los 6 grupos de las genealogías.

VARIACIÓN GENÉTICA Y TIEMPOS DE DIVERGENCIA

Para el gen COI se obtuvieron 72 secuencias con una longitud de 658 pares de bases (Apéndice 1A) que se encuentran entre la posición 42 y 699 del gen completo (1534 pb) de la jaiba *Callinectes sapidus* (GenBank número de acceso AY682075). Al traducir a aminoácido, iniciando el marco de lectura en la segunda posición del codón, no se identificaron codones de stop por lo que se asegura que no se está trabajando con pseudogenes. La mayoría de los cambios encontrados entre las bases fueron transiciones. Los grupos 1, donde se encuentra la localidad tipo de *P. (A.) mirandai*, y 3, aquellos acociles relacionados con *P. (A.) sbordonii*, son los que presentan mayor variación genética, después está el grupo 2 y finalmente los grupos 4, 5 y 6 que no tienen variación (Tabla 4).

La figura 11 presenta un árbol resumido de este gen, se incluyen sólo los 13 haplotipos, para tomarlo en cuenta y referenciar las distancias genéticas que se muestran en la Tabla 5. Con esto se observa que la distancia entre los grupos y éstos con los grupos externos es mayor al 2.4%

En el caso del gen 16S ADNr se obtuvieron 65 secuencias de 532 pares de bases (Apéndice 1B). Los grupos 3 y 1 son los que presentan la mayor variación en ese orden, seguidos del grupo 4 y, a diferencia del COI, el grupo 2, 5 y 6 no presentan diferencias dentro del fragmento amplificado. La Tabla 6 muestra los valores de variación genética de este fragmento y además los gaps que presentan las secuencias dentro de cada grupo.

Para el gen 28S ADNr se obtuvieron 70 secuencias de 495 pb que se encuentran entre el par 725 y el 1217 del gen parcial 28S rADN ribosomal con 1918 pb del acocil *P. clarkii* (GenBank EU920970). Tomando en cuenta que la tasa de variación de este gen es muy baja los diplotipos agruparon varias regiones del estado. Los grupos 1 y 2 presentan el mismo diplotipo; los grupos 4, 5 y *P. (A.) llamasii* otro; el grupo 3 con *P. (A.) sbordonii* un tercero y finalmente la localidad de La Lucha, grupo 6, presenta una inserción de dos pares de bases en la posición 199 del alineamiento originando un cuarto diplotipo.

Tabla 4. Variación genética del COI por grupo. N = número de secuencias; k = número de sitios variables; h = número de haplotipos; HD = diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica.

Grupo	N	k	h	HD	π
1	25	4	5	0.69	0.00157
2	10	1	2	0.2	0.00030
3	9	2	3	0.64	0.00118
4	9	0	1	0.0	0.0
5	12	0	1	0.0	0.0
6	3	0	1	0.0	0.0

Tabla 6. Variación genética del 16S ADNr por grupo. N = número de secuencias; k = número de sitios variables; h = número de haplotipos; HD = diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; G = gaps

Grupo	N	k	h	HD	π	G
1	24	1	2	0.34	0.00065	4
2	9	0	1	0.0	0.0	4
3	8	5	3	0.46	0.00272	4
4	5	1	2	0.6	0.00113	2
5	12	0	1	0.0	0.0	1
6	3	0	1	0.0	0.0	4

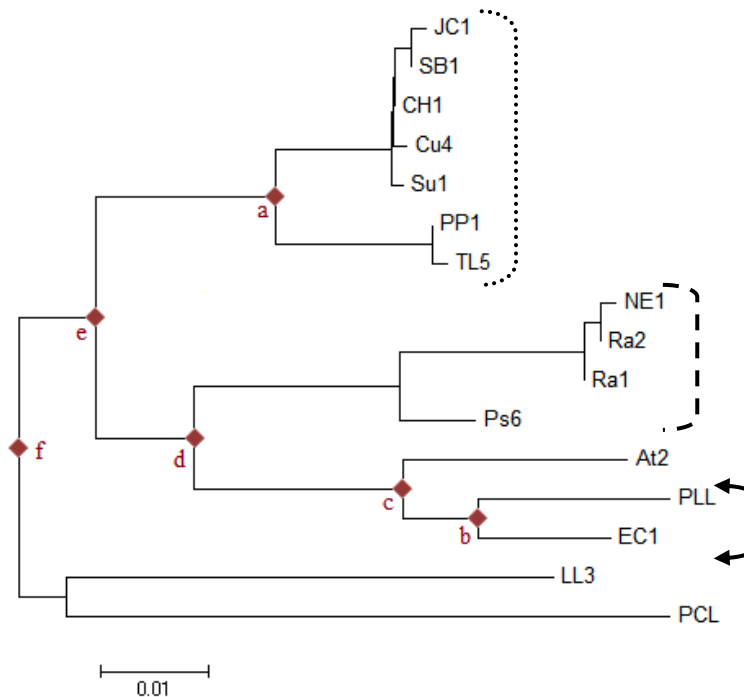


Figura 11. Genealogía de los 13 haplotipos del gen COI y 2 grupos externos (ML). Con rombos y letras a-f guindas se indican los nodos a los cuales se les calculó el tiempo de divergencia. Las diferentes líneas punteadas refieren a las distancias en la Tabla 4.

Tabla 5. Sustituciones por sitio con el gen COI. Las siglas incluyen diferentes poblaciones. **CH:** SB, VC, Cu; **PP:** VA, TL; **SB:** EA; **EC:** PM, CT; **At:** LR. Las diferentes líneas punteadas refieren a nodos en la Figura 11.

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]
[1] CH															
[2] SB	0.002														
[3] JC	0.003	0.002													
[4] Cu4	0.002	0.003	0.005												
[5] Su	0.002	0.003	0.005	0.003											
[6] PP	...0.026...	0.028	0.029	0.028	0.028										
[7] TL5	0.028	0.029	0.031	0.029	0.029	0.002									
[8] Ra1	0.076	0.078	0.080	0.078	0.075	0.076	0.078								
[9] Ra2	0.078	0.080	0.081	0.080	0.078	0.078	0.080	0.002							
[10] NE1	0.080	0.081	0.083	0.081	0.078	0.080	0.081	0.003	0.002						
[11] At	0.075	0.076	0.078	0.076	0.073	0.086	0.087	0.083	0.084	0.086					
[12] EC	0.080	0.081	0.083	0.080	0.078	0.081	0.083	0.063	0.064	0.066	0.049				
[13] LL	0.086	0.087	0.089	0.086	0.087	0.089	0.090	0.102	0.104	0.106	0.106	0.104			
[14] Ps	0.063	0.064	0.066	0.064	0.061	0.066	0.067	-0.024	0.026	0.028	0.075	0.060	0.098		
[15] PII	0.083	0.084	0.086	0.083	0.081	0.092	0.093	0.078	0.080	0.081	0.038	0.031	0.112	0.070	
[16] Pcl	0.098	0.099	0.101	0.096	0.099	0.098	0.099	0.112	0.113	0.115	0.122	0.109	0.102	0.109	0.116

Tabla 7. Tiempos de divergencia (Ma) y distancias genéticas promedio de los nodos que se muestran en la figura 11.

Nodo	Dist. genética promedio	Tiempo de divergencia Ma	
		Tasa 1.2%	Tasa 2.3%
a	2.9%	2,416,700	1,260,870
b	3.1%	2,583,300	1,347,830
c	4.4%	3,666,700	1,913,040
d	3.5%	2,916,700	1,521,740
e	3.2%	2,666,700	1,391,300
f	10.4%	8,666,700	4,521,740

Para los tiempos de divergencia se calculó la distancia genética promedio entre los clados. Se utilizaron dos tasas de mutación del COI: 1.2% y 2.3% por millón de años (Tabla 7). Los nodos se observan en la figura 11.

DISTRIBUCIÓN

Se presenta un mapa del estado de Chiapas en donde los puntos muestran las localidades utilizadas en este estudio y sus colores corresponden a los grupos que se han manejado en la genealogía (Fig. 12). En este primer mapa se puede observar que los grupos genealógicos se encuentran muy cercanos geográficamente. Posteriormente se utilizaron las georeferencias de las localidades y se empataron con un mapa de los ríos de Chiapas, con el fin de observar la correspondencia entre la afluencia de ríos y los diferentes grupos (Fig. 13). Del mismo modo se empataron las distribuciones con un mapa topográfico del estado para saber hacia donde corren los ríos y si pueden o no estar en contacto (Fig. 14). Los tres mapas permiten analizar la correspondencia que hay entre la genealogía y la distribución de los acociles en el estado.

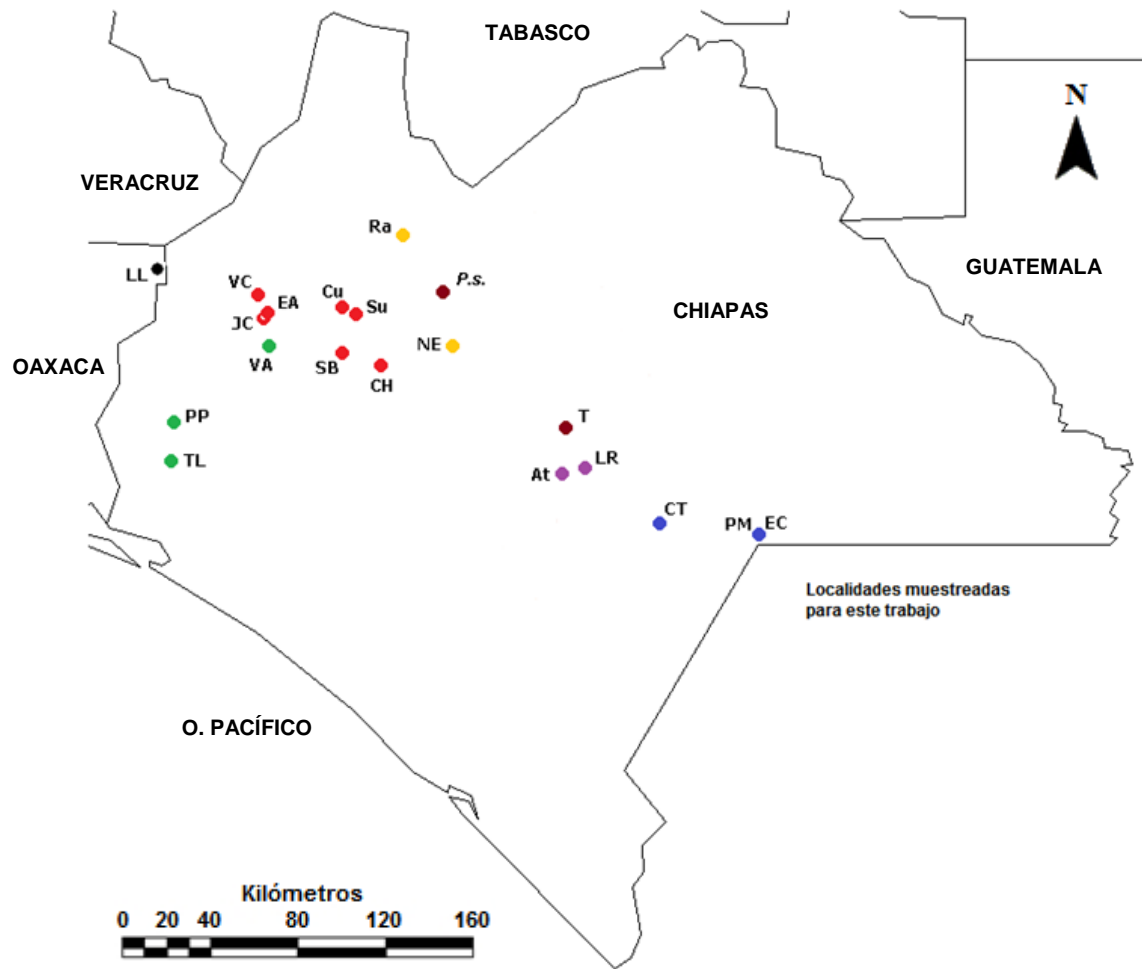


Figura 12. Mapa del estado de Chiapas con la distribución de los grupos que se observan en la genealogía. Los colores indican el grupo: rojo G1, verde G2, naranja G3, morado G4, azul G5 y negro G6. En guinda los grupos externos.

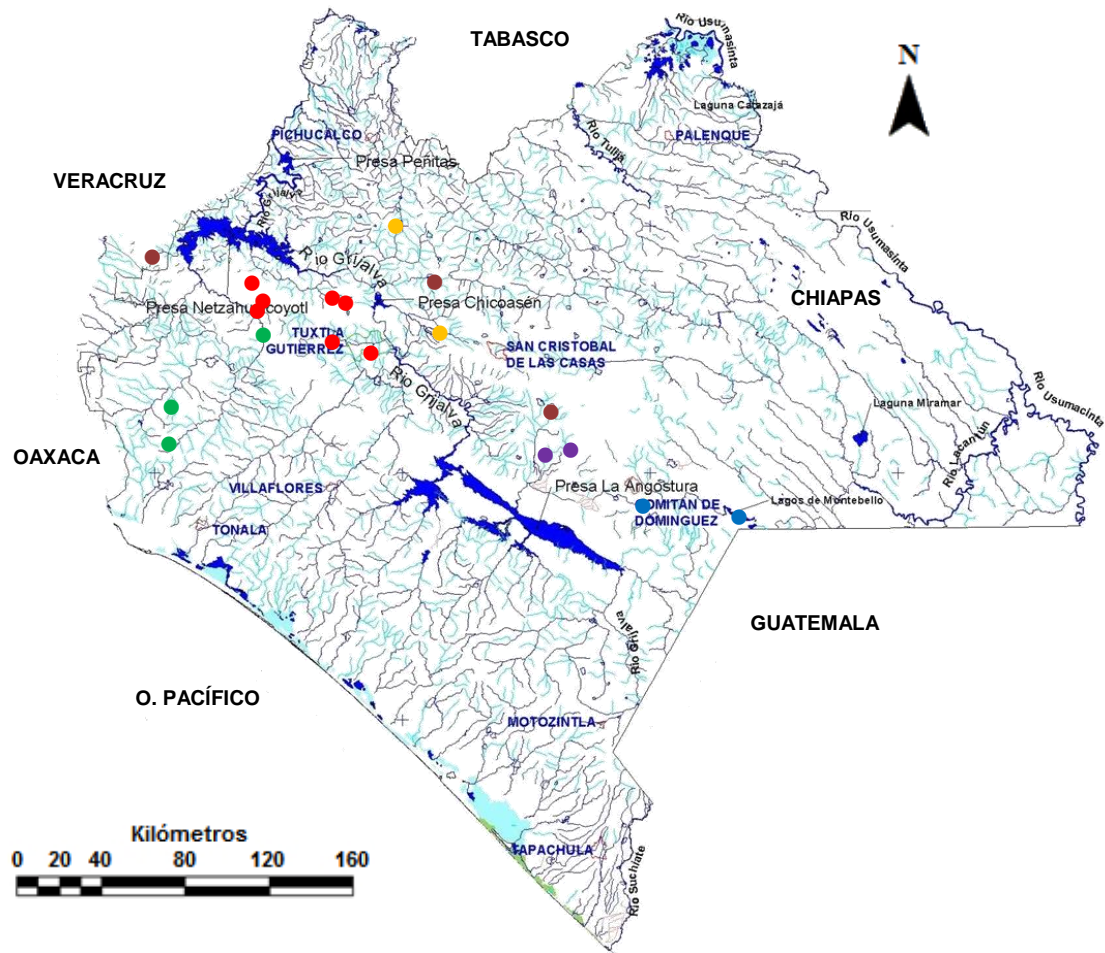


Figura 13. Hidrografía del estado de Chiapas. Las localidades se presentan en puntos de colores que corresponden a los grupos observados en las genealogías de la figura 6.

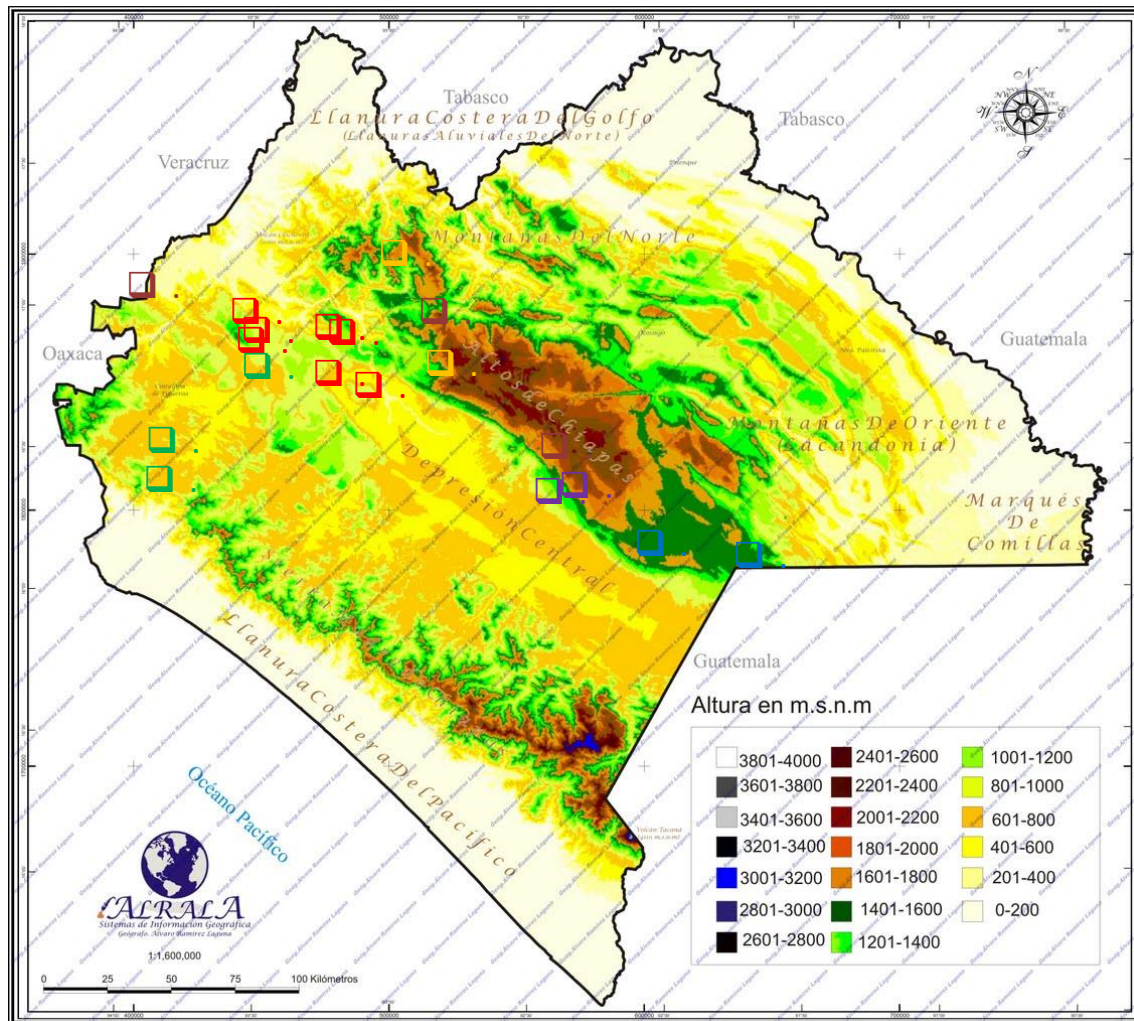


Figura 14. Topografía del estado de Chiapas. Se puede observar para donde fluye el agua. Las localidades se presentan en cuadros de colores que respetan los grupos observados en las genealogías de la figura 6. Tomado de Ramírez, 2014.

MORFOLOGÍA

Los caracteres del caparazón evaluados, espina lateral y branquiostegal, del grupo 2-verde (1 espina lateral, 1 branquiostegal) y el grupo 5-azul (2 espinas lt, 1 bq) así como el grupo 3-naranja (0 espinas lt, 0 bq) resultaron ser consistentes con la genealogía (Tabla 6). Para estos mismos caracteres, las especies que se utilizaron como grupo externos presentan: *P. llamasii* 2 espinas laterales y 3 branquiostegales, *P. sbordonii* 0 y 0 respectivamente y *P. clarkii* 1 y 0 respectivamente. El grupo 1-rojo presenta variación sólo en algunas de las localidades y el grupo 4-morado la diferencia entre las dos localidades es considerable.

Tabla 6. Numero de espinas laterales y branquiostegales en el caparazón. Los triángulos en colores indican el clado en el que se encuentran en la genealogía.

Localidad	Espina lateral	Espina branquiostegal	Grupo en árbol
Arroyo Palo Pique	1	1	▲
El Sabinal	0	1	▲
Laguna El Carrizal	2	1	▲
Arroyo Teopisca-Villa de las Rosas	1	0	GE
Arroyo El Chile, Sn Antonio Tzujulá	2	2	▲
Charco cerca de la Laguna El Carrizal	2	1	▲
Poza de agua Comitán-La Trinitaria	2	1	▲
Arroyo Veinte Casas	1	1	▲
Río La Venta	1	1	▲
Nuevo San Juan Chamula	0	1	▲
Arroyo Tierra y Libertad	1	1	▲
Arroyo Villa de las Rosas-Comitán	0	1	▲
Cueva La Lucha	1	1	▲
Arroyo en Rayón	0	0	▲
Manantial "Nuevo Edén"	0	0	▲
Arroyo de Cerro Hueco	0	1	▲
Sumidero del Higo	0	0	▲
Cueva de Cuauhtémoc	0	0	▲
El Aguajón	0	0	▲

La figura 15 muestra el acomodo de las 4 vistas del pleópodo en los diferentes grupos, la fotografía exhibe el morfo más representativo. Se observan diferencias marcadas entre grupos, no así dentro de los grupos. En el apéndice 3 se muestra el mapeo de los caracteres en el árbol de los 3 genes concatenado.

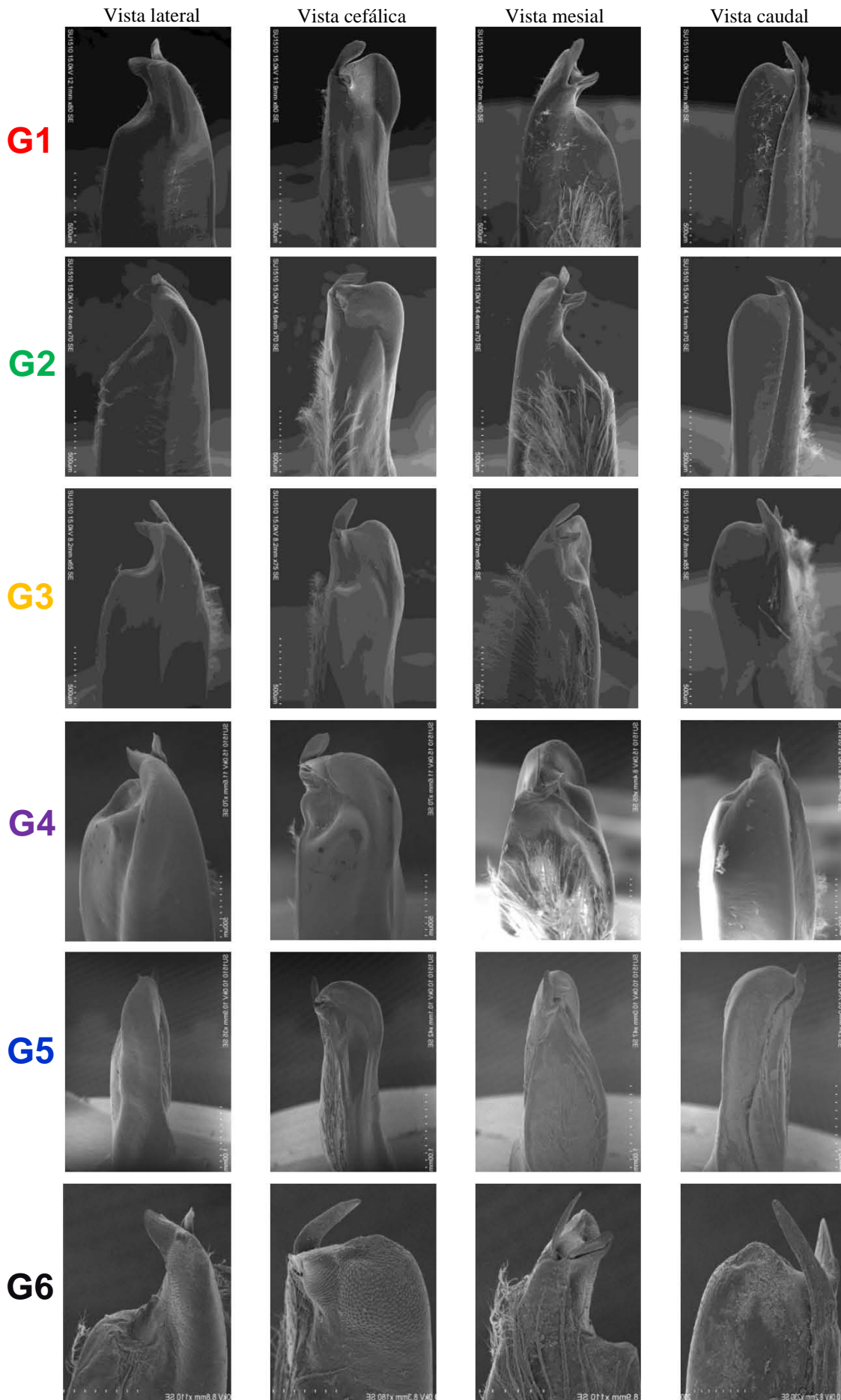


Figura 15. Fotografías de Microscopía electrónica del primer par de pleópodos del macho forma I.

DISCUSIÓN

VARIACIÓN GENÉTICA Y TIEMPO DE DIVERGENCIA

Elevaciones orográficas y ríos que vierten en varias direcciones, generan en Chiapas un territorio sumamente heterogéneo que permite se desarrollen diferentes organismos y, sumado con los demás estados hacen de México uno de los 17 países con mayor diversidad biológica. Los estudios de la biodiversidad en una determinada región son focales en la biología, y la unión de diferentes fuentes de evidencias pueden ayudar a concretar o discernir sobre el hallazgo de nuevos linajes o especies.

La distancia genética ha sido una evidencia cuantitativa para delimitar a las especies, sin embargo no hay un porcentaje de diferencia genética estándar que delimite una especie y otra, como lo menciona Filipová *et al.* (2010) en un trabajo donde compara entre *Orconectes virilis* británicos y holandeses introducidos y sus homólogos nativos distribuidos en Norte América. Ellos observaron que todos los *Orconectes* evaluados en Europa pertenecen al mismo linaje, separado de cualquier clado del complejo Norteamericano. El porcentaje de divergencia del linaje Europeo con algún otro oscila del 1.21% a 3.9% con el COI. Este valor de divergencia, a pesar de ser relativamente bajo, es comparable con la divergencia que hay entre otros linajes del complejo: *O. deanae* y *O. cf virilis* que es de 1.26%. Al siguiente año, Filipová *et al.* (2011), utiliza el código de barras para verificar que las identificaciones sobre acociles invasores encontrados en Europa coincidan con sus correspondientes poblaciones nativas en los Estados Unidos. En sus resultados se pueden observar distancias genéticas parecidas a las que se presentan entre diferentes especies, pero con la diferencia de que en teoría se trata de la misma especie, por lo que estos autores concluyen que se puede tratar de una diversificación de tiempo reciente. Las poblaciones de acociles de Chiapas, si bien se distinguen seis grupos, aún queda la duda si son diferentes a los que están cercanamente emparentados en el árbol (*P. sbordonii* o *P. llamasii*). Probablemente se trate de una diversificación que apenas inicia.

Son pocos los trabajos que se han hecho acerca de la variación genética de los acociles del país (Barriga-Sosa *et al.*, 2010; Torres *et al.* 2013) por lo que resulta algo complejo calcular el porcentaje de diferencia genética adecuado para diferenciar especies de estos organismos en la región. Por lo anterior en este trabajo, además de las aproximaciones genéticas, se utilizaron otras fuentes de información (distribución y morfología) para ayudar a proponer si se trata o no de la misma especie en el siguiente apartado.

El tiempo en que se calculó diversificaron los grupos de acociles en Chiapas se ubica a finales del Mioceno y el Plioceno (6.5-1.8 millones de años). La evolución geológica de Chiapas podría explicar en parte la divergencia en el complejo de acociles estudiado.

Desde el Oligoceno tardío, convergen en el sureste mexicano las placas tectónicas Norteamericana, del Caribe y de Cocos, lo que origina, desde un punto de vista geológico, una de las áreas más complejas de Norteamérica (Padilla y Sánchez, 2007). La elevación y descenso en el nivel del mar fue una constante para el sureste mexicano (Fig.16), aun durante el Jurásico medio la mitad del estado de Chiapas se encontraba bajo el mar, y durante el Cretácico temprano las porciones emergidas cada vez fueron menores, con excepción de la costa que da al Pacífico y la Sierra Madre de Chiapas, que emergió antes del Mesozoico (Padilla y Sánchez, 2007). Esta condición de zonas bajo el agua es evidente pues durante el Oligoceno y el Mioceno temprano, en todo el sureste hay patrones sedimentarios que dejan ver rocas clásticas. Dos eventos importantes que coinciden con los tiempos en que divergieron los grupos de acociles en el estado son: en el Mioceno medio (Serravaliano 12 Ma) ocurrió el llamado Evento Chiapaneco (Sánchez, 1980), que es la máxima etapa de deformación que plegó y cabalgó las rocas de la cadena de Chiapas-Reforma-Akal y acortó el Macizo de Chiapas. El otro evento, hacia finales del Mioceno e inicios del Plioceno, es el basculamiento hacia el norte de la cadena Chiapas-Reforma-Akal, como una respuesta al desalojo de la sal calloviana, acompañada de salida de magma y actividad volcánica (Mulleried, 1957). El gran aporte de clásticos provenientes del Macizo de Chiapas durante el Plioceno y el Pleistoceno, causó el depósito de varios kilómetros de espesor de sedimentos, cuya sobrecarga empezó a generar grandes fallas (Fig. 17) (Padilla y Sánchez, 2007).

Actualmente la red hidrológica en el estado de Chiapas, incluyendo los embalses que generaron las presas, hacen pensar que todos los ríos están comunicados, sin embargo no siempre fue así, lo descrito antes permite pensar que diferentes accidentes altitudinales, como cascadas o algunas fallas, han separado las poblaciones y diversificado a los acociles en el estado.



Figura 16. Mapa paleontológico de América del Norte. Se observa que la zona de Chiapas aun no emerge por completo. Cortesía de R. Blakey.

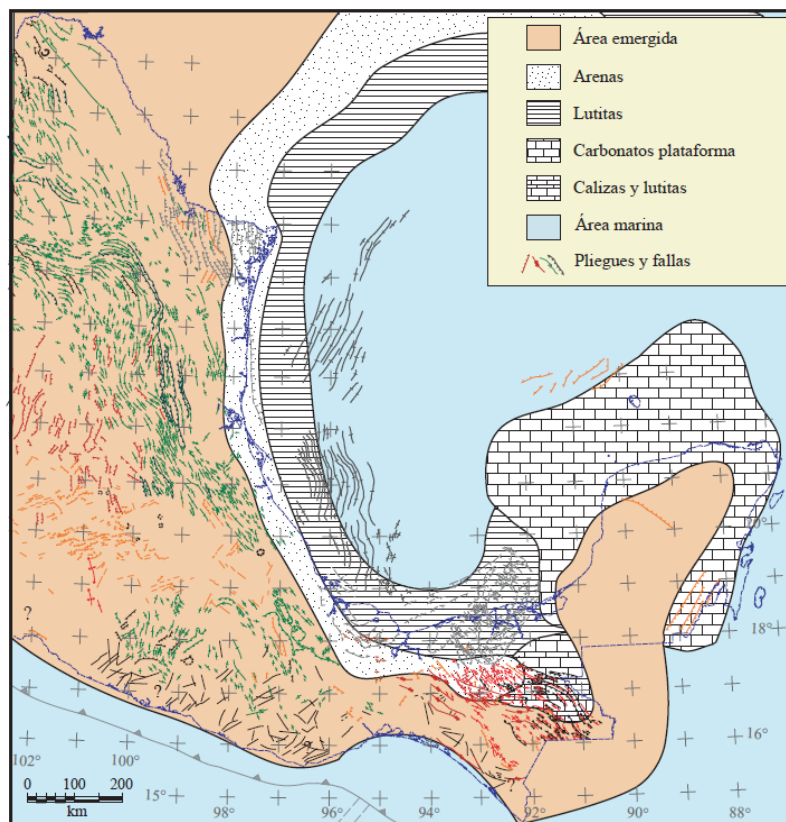


Figura 17. Paleogeografía del Mioceno tardío. Las costas y las fronteras del país se muestran como referencia. Tomado de Padilla y S., 2007.

¿CONSTITUYE *PROCAMBARUS (A.) MIRANDAI* UN COMPLEJO DE ESPECIES?

La determinación y delimitación entre las especies es algo complejo, si se toman en cuenta diferentes fuentes de datos el proceso puede resultar menos tortuoso. En este sentido, las aproximaciones geográficas, morfológicas y genéticas permiten realizar las siguientes determinaciones. El grupo 1, donde se encuentran los acociles de la localidad tipo de *P. (Austrocambarus) mirandai*, y su grupo más cercano (G2) presentan un porcentaje de divergencia promedio de 2.9% en el gen COI, que es relativamente bajo (Filipová *et al.*, 2010; Breinholt *et al.*, 2012; Ainscouch *et al.*, 2013), y la distribución geográfica que presentan podría estar marcando algún grado de supresión de flujo genético. El G1 se encuentra en ríos que vierten directamente a la presa Malpaso (Nezahualcoyotl) o en ríos tributarios del Grijalva que pasando por la presa Chicoasen y de allí a la presa Malpaso. Por otro lado, el G2 ocurre en cauces que vierten al río La Venta, tributario de la presa Malpaso. Lo anterior permite suponer que ambos grupos ya no estarán en contacto geográficamente y que con el tiempo ésto llevará a una divergencia genética mayor. En cuanto a la morfología, utilizando las fotografías del primer pleópodo del macho forma I, se puede observar en la vista cefálica del G1 la cresta distal de la placa lateral con una curvatura elevada y más aguda que en el G2, cuya curvatura es ampliamente redondeada. También se observa una espina ligeramente marcada en el margen superior de la proyección centro caudal en los pleópodos de G2 ausente en el G1. El hombro cefálico en ambos grupos es inclinado en su margen distal.

El G3 tiene un porcentaje de divergencia promedio de 2.6% con el acocil *Procambarus sbordonii*. Los pleópodos de este grupo son parecidos a los de *P. sbordonii*, pues presentan una espina en el margen superior de la proyección centro caudal, más marcada que la presente en el G2. El hombro cefálico es arqueado-cóncavo en el margen distal. En cuanto a las espinas laterales y branquiotegales ambos, G3 y *P. sbordonii*, no presentan. Los colectores de las muestras mencionan que las localidades estaban separadas por algunas lomas y terreno muy accidentado, además de que geográficamente están algo distantes, sin embargo los demás factores considerados, morfología y variación genética, sugiere que se trate de la misma especie, *P. sbordoni*.

De los siguientes dos grupos, G4 y G5, con una distribución al centro sur del estado y que presentan un porcentaje de divergencia promedio entre ellos de 4.4%, se puede decir que no son la misma especie. Una es la que se encuentra en el municipio de Las Rosas (G4) y aquellas que se distribuyen en las Lagunas de Montebello, municipios de La Trinitaria y Comitán (G5), son otra especie. Las localidades del G4 se encuentran

en arroyos o canales tributarios de La Angostura, presa en la parte alta del río Grijalva; presentan dos espinas laterales y dos branquiostegales; el pleópodo del macho forma I exhibe una oquedad en el hombro cefálico, un proceso mesial de forma foliácea (ancha en su base y terminada en punta) y no adelgazado como en los demás grupos, la cresta distal de la placa lateral es muy redondeada. En el G5, sus localidades: Laguna el Carrizal y Comitán, en charcos y lagunas que fluyen hacia el Parque Nacional Lagunas de Montebello, presentan dos espinas laterales y una branquiostegal. En el pleópodo del macho forma I no se observa hombro cefálico, la cresta distal de la placa lateral con una curvatura redondeada y el proceso mesial es igualmente ancho en su base que en la punta. Las diferencias altitudinales en la distribución de estos dos grupos G4 y G5 impiden el flujo génico entre ellos. El acocil *P. (A.) llamas* se ubicó como especie cercanamente emparentada a estos dos grupos, la divergencia genética que presenta es de 3.8% con el G4 y 3.1% con el 5. Sin embargo, la distribución de G4 y G5 no se encuentra dentro del rango de distribución reportada para *P. llamas* en Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Tabasco (Villalobos, 1954; Rodríguez *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2013). Álvarez *et al.*, (2011), reportaron *P. (A.) llamas* en dos localidades de Chiapas: El Huiral a 1 km del poblado de Canán en la carretera Chankala-Lacanjá, en el municipio de Palenque y en el km 85 de la carretera Palenque-Ocosingo, municipio de Chilón, ellos mencionan que estos acociles muestran un cierto grado de variación morfológica en la longitud total, densidad y extensión de la pubescencia en los quelípedos y longitud de los quelípedos y que no se tiene la certeza de que se trate de *P. (A.) llamas*. Morfológicamente el pleópodo del macho y las espinas laterales y branquiostegales tampoco coinciden entre *P. llamas* y estos dos nuevos grupos, G4 y G5.

Por último, el G6 cuya distribución es el Sótano de La Lucha, podría tratarse de un nuevo género con un porcentaje de divergencia de 10.4% con respecto a los demás grupos. En el pleópodo del macho forma I se observa muy parecido al del G3 en cuanto al hombro cefálico por ser arqueado en su margen distal; se observa una espina ligeramente marcada en el margen superior de la proyección centro caudal parecida a las que muestra el G2; la cresta distal de la placa lateral tiene su curvatura redondeada. La distancia genética y el estilo de vida estigobiónte hacen a este grupo particularmente diferente de los acociles chiapanecos, por lo que habría que colocar sus secuencias con algunas otras del mismo subgénero *Austrocambarus* y hacer más comparaciones

morfológicas para ver el alcance de las diferencias y probablemente sugerir un nuevo género (J. L. Villalobos *com. pers.*).

CONCLUSIONES

- En la genealogía se pueden observar 6 grupos diferentes con una distancia genética mínima de 2.4%.
- El G1 y el G2 localizados al centro del estado, con un porcentaje de divergencia promedio de 2.9% en el gen COI, por su distribución podrían presentar algún grado de supresión de flujo genético.
- La evidencias morfología y de variación genética, sugiere que las localidades del G3 pertenecen al acocil *P. sbordonii*.
- Por la distancia genética que hay entre ellos, de 4.4%, y la diferencia altitudinal entre sus localidades, los G4 y G5 distribuidos al centro sur del estado, pueden ser especies independientes.
- El G6, por la distancia genética que guarda con respecto a otros grupos y su estilo de vida estigobionte, podría tratarse de un nuevo género.
- En su mayoría los análisis filogenéticos, la distribución geográfica y los caracteres morfológicos muestran consistencia en cuanto a la definición de los grupos.
- Actualmente la red hidrológica regional, incluyendo los embalses que generaron las presas, hacen pensar en un continuo entre los ríos o que todos están comunicados, sin embargo no siempre fue así, por ejemplo diferentes accidentes altitudinales, como cascadas o algunas fallas, han separado las poblaciones.
- De acuerdo a la morfología del primer pleópodo del macho forma I, las diferencias entre el G1 y G2 no son muy claras. El G3 es muy parecido a *P. (A.) sbordonii*. Para los demás grupos, existe una diferencia significativa.
- Los tiempos de divergencia entre secuencias sugieren un periodo de diversificación durante el Mioceno tardío-Plioceno. En esta etapa Chiapas sufre algunas modificaciones como el Evento Chiapaneco y el basculamiento de la cadena Chiapas-Reforma-Akal.

LITERATURA CITADA

- Aguilar V. S. 2011. Recuento de la diversidad de especies de Chiapas registradas en el SNIB. *En* Álvarez F. (ed.). 2011. Chiapas: estudios sobre su diversidad biológica. México, D. F. 512 pp.
- Álvarez, F., M. López-Mejía, J. L. Villalobos. 2007. A new species of crayfish (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) from a salt marsh in Quintana Roo, Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 120(3): 311-319.
- Álvarez, F., J.L. Villalobos, M. Gutiérrez y G. Rivera. 2011. Crustáceos dulceacuícolas y terrestres de Chiapas. *En* Álvarez F. (ed.). 2011. Chiapas: estudios sobre su diversidad biológica. México, D. F. 512 pp.
- Álvarez, F., J. L. Villalobos y R. Robles. 2005. Crustáceos. *En*: Bueno, J., F. Álvarez y S. Santiago (eds.). Biodiversidad del estado de Tabasco. *Instituto de Biología, UNAM/CONABIO*, México, D.F. p. 177-194.
- Ainscough, B. J., J. W. Breinholt, H. W. Robison y K. A. Crandall. 2013. Molecular phylogenetics of the burrowing crayfish genus *Fallicambarus* (Decapoda: Cambaridae). *Zoologica Scripta* 00, 000–000.
- Barriga-Sosa, I. D. L. A., M. Rodríguez-Serna, C. Carmona-Osalde, C. Gárnica-Rivera, P. Acuña-Gómez y J. L. Arredondo-Figueroa. 2010. Genetic identity and diversity of *Procambarus llamasi* (Decapoda, Astacidae, Cambarinae) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Crustaceana* 83 (9): 1035-1053
- Beebee, T. y G. Rowe. 2004. An introduction to molecular ecology. Oxford. Oxford University. U.S.A., 346 p.
- Bond-Buckup, G., C. G. Jara, L. Buckup, M. Pérez-Losada, A. A. P. Bueno, K. A. Crandall y S. Santos. 2010. New species and new records of endemic freshwater crabs from the Atlantic forest in Southern Brazil (Anomura: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology* 30(3): 495-502.
- Breinholt, J. W., M. L. Porter y K. A. Crandall. 2012. Testing phylogenetic hypotheses of the subgenera of the freshwater crayfish genus *Cambarus* (Decapoda: Cambaridae). *PLoS ONE* 7(9): e46105.doi:10.1371/journal.pone.0046105.
- Buhay, J. y K. A. Crandall. 2005. Subterranean phylogeography of freshwater crayfishes shows extensive gene flow and surprisingly large population sizes. *Molecular Ecology* 14: 4259-4273.
- Buhay, J. y K. Crandall. 2008. Taxonomic revision of cave crayfishes in the genus *Orconectes*, subgenus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae) along the Cumberland Plateau, including a description of a new species, *Orconectes barri*. *Journal of Crustacean Biology* 28(1): 57-67.
- Chu, K. H., L. M. Tsang, K. Y. Ma, T. Y. Chan y P. K. L. Ng. 2009. Decapod Phylogeny: What Can Protein-Coding Genes Tell Us? *En*: Martin J.W., K. A.

- Crandall y D. L. Felder (eds). Decapod Crustacean Phylogenetics. New York: CRC Press. pp. 89–99.
- Clement, M., D. Posada y K. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.
- Crandall, K. A. 1997. Genetic variation within and among crayfish species. *Freshwater Crayfish* 11: 135-145
- Crandall, K. A., D. Harris y J. Fetzner, Jr. 2000. The monophyletic origin of freshwater crayfish estimated from nuclear and mitochondrial DNA sequences. Proceedings of the Royal Society of London, series B 267: 1679-1686.
- Crandall, K. A., H. W. Robison y J. E. Buhay. 2009. Avoidance of extinction through nonexistence: the use of museum specimens and molecular genetics to determine the taxonomic status of an endangered freshwater crayfish. *Conservation Genetics* 10:177–189.
- Crandall, K. A. y J. Fitzpatrick, Jr. 1996. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. *Systematic Biology* 45(1):1-26.
- Crandall, K. A. y T. W. Cronin. 1997. The molecular evolution of visual pigments in freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae). *Journal of Molecular Evolution* 45: 524-534.
- Edwards, D. H., W. J. Heitler y F. B. Krasne. 1999. Fifty years of a command neuron: the neurobiology of escape behavior in the crayfish. *Trends Neurosci* 22: 153-161.
- Erichson, W. F. 1846. Übersicht der Arten der gattung *Astacus*. *Archives für Naturgeschichte*. Zwölfter Jahrgang Erster Band mit Zwölf Knpferften. Berlin. 12(1): 86-103.
- Dessauer, H. C., C.J. Cole y M. S. Hafner. 1996. Collection and Storage of Tissues. pp 29-47. *En*: Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable (eds). Molecular Systematics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U.S.A., 382 p.
- Fetzner, J. Jr. 2008. The crayfish (and lobster) taxonomy browser. Section of Invertebrate Zoology Carnegie Museum of Natural History. <http://iz.carnegiemnh.org/crayfish/NewAstacidea/genus.asp?g=Procambarus>
- Filipová, L., D. M. Holdich, J. Lesobre, F. Grandjean y A. Petrusek. 2010. Cryptic diversity within the invasive virile crayfish *Orconectes virilis* (Hagen, 1870) species complex: new lineages recorded in both native and introduced ranges. *Biological Invasions* 12:983–989.
- Filipová, L., F. Grandjean, C. Chucholl, D.M. Soes y A. Petrusek. 2011. Identification of exotic North American crayfish in Europe by DNA barcoding. *Knowledge and Management of Aquatic ecosystems* 401:11
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.

- García, P. B., F. J. Vega, G. Carbot y M. A. Coutiño. 2011. El registro fósil en Chiapas: 250 millones de años de biodiversidad. *En* Álvarez F. (ed.). 2011. Chiapas: estudios sobre su diversidad biológica. México, D. F. 512 pp.
- Garvey, J. E., R. A. Stein y H. M. Thomas. 1994. Assessing how fish predation and interspecific prey competition influence a crayfish assemblage. *Ecology* 75: 532-547.
- Harper, D. M., A. C. Smart, S. Coley, S. Schmitz, A. C. Gouder de Beauregard, R. North, C. Adams, P. Obade, M. Kamau. 2002. Distribution and abundance of the Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii* Girard at Lake Naivasha, Kenya between 1987 and 1999. *Hydrobiologia* 488: 143-151.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hillis, D. M., B. K. Mable, A. Larson, S.K. Davis y E.A. Zimmer. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. Pp 321-381. *En*: Hillis, D. M., C. Moritz y B.K. Mable (eds). Molecular Systematics. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, U. S. A. 2a Ed, 655 p.
- Hobbs, H. H., Jr. 1942. A generic revision of the crayfishes of the subfamily *Cambarinae* (Decapoda, Astacidae) with the description of a new genus and species. *American Midland Naturalist* 28(2): 334-357.
- Hobbs, H. H., Jr. 1972a. Biota of Freshwater Ecosystems Identification Manual No. 9. Environmental Protection Agency. 173 p.
- Hobbs, H. H., Jr. 1972b. The subgenera of the crayfish genus *Procambarus* (Decapoda: Astacidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 117: 1-22.
- Hobbs, H. H., Jr. 1981. The Crayfishes of Georgia. *Smithsonian Contributions to Zoology* 318:1-549
- Hobbs, H. H., Jr. 1989. An illustrated checklist of the American crayfish (Decapoda: Astacidae, Cambaridae, and Parastacidae). *Smithsonian Contribution to Zoology* 480: 1-236.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Huxley, T. H. 1880. The Crayfish: an introduction to the study of zoology. New York: D. Appleton.
- Johnson, G. T., J. F. Elder, S. M. Thomson, P. Hightower y D. Bechler. 2011. Phylogeny of the freshwater crayfish subfamily *Cambarinae* based on 16S rDNA gene analysis. *Current Trends in Ecology* 2: 97-113.
- Ketmaier, V., R. Argano y A. Caccone. 2003. Phylogeography and molecular rates of subterranean aquatic stenasellid isopods with a peri-Tyrrhenian distribution. *Molecular Ecology* 12: 547-555

- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>
- Markow, T. A. y E. Pfeiler. 2010. Mitochondrial DNA evidence for deep genetic divergences in allopatric populations of the rocky intertidal isopod *Ligia occidentalis* from the eastern Pacific. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 468–473.
- Martínez, E., J. E. Sosa y F. Álvarez. 2014. El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección?. *Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl.* 85: S1-S9.
- Mulleried, K. G. 1957. La geología de Chiapas. Gobierno Constitucional del Estado de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chis. 179 pp.
- Nystrom, P. 2002. Ecology. En: Holdich D. (ed), *Biology of Freshwater Crayfish*. Blackwell Science, Oxford, pp. 192-235.
- Ortmann, A.E. 1905a. The mutual affinities of the species of the genus *Cambarus*, and their dispersal over the Unites States. *Proceedings of the American Philosophical Society* 44(180): 91-136.
- Ortmann, A.E. 1905b. *Procambarus*, a new subgenus of the genus *Cambarus*. *Annals of the Carnegie Museum* 3(3): 435-442.
- Padilla y Sánchez, R.J. 2007. Evolución geológica del Sureste Mexicano desde el Mesozoico al Presente en el contexto regional del Golfo de México. *Boletín Sociedad Geológica Mexicana* 59 (1), p. 19-42.
- Posada, D. y K.A. Crandal. 1998 Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Posada, D., K.A. Crandal y A.R. Templeton. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487-488.
- Rambaut, A. y A. J. Drummond. 2003-2009. MCMC Trace Analysis Tool. Version 1.5.0, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Rambaut, A. 2006-2009. Tree Figure Drawing Tool. Version 1.3.1, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Ramírez, A. 2014. Geografía del Estado de Chiapas. <http://geochiapas.blogspot.mx/2011/06/altimetria-de-chiapas.html>
- Rodríguez, M., C. Carmona, J.L. Arredondo y M.A. Olvera. 2002. Distribución geográfica actual de *Procambarus (Austrocambarus) llamasi* (Cambaridae) en la Península de Yucatán. *Hidrobiológica* 12:1-5.

- Rodríguez C.F., E. Bécares, M. Fernández-Aláez, C. Fernández-Aláez. 2005. Loss of diversity and degradation of wetlands as a result of introducing exotic crayfish. *Biological Invasions* 7: 75-85.
- Rosas, M. 2012. Distribución de los crustáceos decápodos de agua dulce de México. *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis y H. Erlich. 1988. Primer directed enzymatic amplifications of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sánchez-Montes de Oca, R. 1980. Geología petrolera de la Sierra de Chiapas. *Bol. Asoc. Mex. Geol. Petrol.*, v. 31, Nos. 1-2, p. 67-77.
- Schubart, C., R. Diesel y S. Hedges. 1998a. Rapid evolution to terrestrial life in Jamaican crabs. *Nature* 393: 363-365.
- Sequencher® version 4.8 sequence analysis software. Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA <http://www.genecodes.com>
- Shull, H. C., M. Pérez-Losada, D. Blair, K. Sewell, E. A. Sinclair, S. Lawler, M. Ponniah y K. A. Crandall. 2005. Phylogeny and biogeography of the freshwater crayfish *Euastacus* (Decapoda: Parastacidae) based on nuclear and mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 249-263.
- Stamatakis, A., P. Hoover y J. Rougemont. 2008. A Rapid Bootstrap Algorithm for the RAxML Web-Servers. *Systematic Biology* 75(5): 758-771.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taylor, C. y M. Hardman 2002. Phylogenetics of the crayfish subgenus *Crockerinus*, genus *Orconectes* (Decapoda: Cambaridae), based on Cytochrome Oxidase I. *Journal of Crustacean Biology* 22(4): 874-881.
- Templeton, R., E. Routman y C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population Hhistory: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Toon, A., M. Finley, J. Staples y K. A. Crandall. 2009. Decapod phylogenetics and molecular evolution. *En: Martin J.W., K. A. Crandall y D. L. Felder (eds). Decapod Crustacean Phylogenetics*. New York: CRC Press. pp. 15-30.
- Torres, E. y F. Álvarez. 2012. Genetic variation in native and introduced populations of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) in Mexico and Costa Rica. *Aquatic Invasions* 7: 235-241.
- Torres, E., F. Álvarez y A. Botello. 2013. Variación genética de *Procambarus llamasii* (Decapoda: Cambaridae) en la península de Yucatán: evidencia de conectividad en un paisaje fragmentado. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4): 762-772.

- Villalobos, A. 1954. Revisión de las especies afines a *Procambarus mexicanus* (Erichson), con descripción de nuevas formas. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 25(1-2): 364-371.
- Villalobos, A. 1955. Cambarinos de la Fauna Mexicana (Crustacea, Decapoda). *Tesis de Doctorado*, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Villalobos, J. L. y F. Álvarez. 2013. Two new genera and three new species of freshwater crabs (Crustacea: Pseudothelphusidae: Potamocarcinini) from Chiapas, Mexico. *Zootaxa* 3599: 457-470.
- Wald, G. 1967. Visual pigments of crayfish. *Nature* 215: 1131-1133.
- Whiting, M., J. Carpenter, Q. Wheeler y W. Wheeler. 1997. The strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18s and 28s ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology* 46(1):1-68.

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Hap 1 CH1	TTCCCTTTAATGTTAGGGGCTCCAGATATAGCATTTCCTCGTATAAATAATATAAGATTTTGACTTTCCTTTTTCTCTAACTTTATTATTAAGGGG									
Hap 2 Cu4									
Hap 3 Su1G.....									
Hap 4 SB1									
Hap 5 JC1									
Hap 6 PP1									
Hap 7 TL1									
Hap 8 NE1	A	T	G	G			G	G	G	
Hap 9 Ra2	A	T	G	G			G	G	G	
Hap 10 Ra1	A	T	G	G			G	G	G	
Hap 11 At2	A	T	G	G	C	C	GT	A	G	T
Hap 12 EC1	C	A	T	G	G		A		G	T
Hap 13 LL3	G	A	T		A			T		A
<i>P. sbordonii</i>		T	G	G			N	G	G	
<i>P. llamasii</i>	A	T	G	C	G	G	C	T	A	G
<i>P. clarkii</i>	A	T	G	T	A	G		T	G	

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Hap 1 CH1	AATAGTGAAAGAGGAGTTGGAAGTGGTGGACGGTGTACCCTCCTTTAGCTTCTGCTATTGCTCATGCAGGAGCATCAGTAGATCTGGGTATTTTTTCT									
Hap 2 Cu4									
Hap 3 Su1									
Hap 4 SB1									
Hap 5 JC1									
Hap 6 PP1			A	T		C			A	
Hap 7 TL1			A	T		C			A	
Hap 8 NE1	A	G	C	T	A	A	T	T	C	G
Hap 9 Ra2	A	G	T	A	A	T	T	C	G	C
Hap 10 Ra1	A	G	T	A	A	T	T	C	G	C
Hap 11 At2	A	C	G			A		C	G	T
Hap 12 EC1	G	A		A	A	A	T	A		G
Hap 13 LL3	T	A	G	G	A			A	G	G
<i>P. sbordonii</i>	A	G	T	A	A	T		G		T
<i>P. llamasii</i>	G	A	G	A	T		A	C	G	T
<i>P. clarkii</i>	T	T	G	A	A	T	T	G	T	T

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Hap 1 CH1	TTACATTTAGCAGGGGTGTCTTCAATTTTAGGTTTCAGTAAATTTTATAACAACAGCTATTAATATACGTACTGTGGGGATAACTATAGATCGAATACCAT									
Hap 2 Cu4									
Hap 3 Su1									
Hap 4 SB1									
Hap 5 JC1									
Hap 6 PP1									
Hap 7 TL1									
Hap 8 NE1									
Hap 9 Ra2									
Hap 10 Ra1									
Hap 11 At2									
Hap 12 EC1									
Hap 13 LL3									
<i>P. sbordonii</i>									
<i>P. llamasii</i>									
<i>P. clarkii</i>									

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
Hap 1 CH1	TATTTGTTTGGTCTGTGTTTATTACTACTGTGTTATTATTATTGTCTTTACCTGTTTTAGCTGGAGCGATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAA									
Hap 2 Cu4									
Hap 3 Su1									
Hap 4 SB1									
Hap 5 JC1									
Hap 6 PP1									
Hap 7 TL1									
Hap 8 NE1									
Hap 9 Ra2									
Hap 10 Ra1									
Hap 11 At2									
Hap 12 EC1									
Hap 13 LL3									
<i>P. sbordonii</i>									
<i>P. llamasii</i>									
<i>P. clarkii</i>									

B. Alineamiento del fragmento amplificado de 16S rRNA. Las siglas indican la localidad y organismo representativo del haplotipo. Misma base que *P. (A.) mirandai* (CH1) (.), deleción o inserción (-).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

CH1	GTCTTTTATGAAGGTTTATAAAGTCTAACCTGCCCATTTGGAAACTAAAAGGCCGCGGTATTATGACCGTGCAAAGGTAGCATAATCATTAGTTTTTTAATT									
Cu1									
TL1A.....G.....									
NE2AG.....T.....A.....									
Ra2AG.....T.....A.....									
At2G.....T.....									
LR1G.....									
PM1G.....C.....									
LL3G.T.G.....									
<i>P. sbordonii</i>AG.....T.....A.....									
<i>P. llamasii</i>	-----									
<i>P. clarkii</i>	-----G.....G.....-									

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200

CH1	GAAGGCTAGAATGAATGGTTGGACAAGAAATAATCTGTCTTAATTAACATATTGAATTTAACTTTTAAGTGAAAAGGCTTAAATAATCTGAAGGGACGA									
Cu1									
TL1									
NE2T.....									
Ra2T.....									
At2T.....G.....									
LR1T.....G.....									
PM1T.....G.....									
LL3	..G.....A.....G.....									
<i>P. sbordonii</i>N.....									
<i>P. llamasii</i>T.T.....G.....									
<i>P. clarkii</i>A.T.T.....G.....									

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CH1	TAAGACCCTATAAAAACCTTTATACT--TAAGTATAGTAGTCAGTTTTATGTAGTGTATTATA-TTTTTTAGTATTCGGTTGGGGTGACAAGGATAAAAATAAA									
Cu1--A.....-									
TL1--A.....T.....T.....AGG.....G.									
NE2G.--A.....T.....-.....AGG.....T.....									
Ra2G.--A.....T.....-.....AGG.....T.....									
At2TA..A.....T.....-.....AAG.....									
LR1TA..A.....T.....-.....AAG.....									
PM1TA.....T.....-.....AAG.....T.....									
LL3T.--A.....A.T.....A.....-.....AAA.....TA.....T.....G..									
P. sbordoniiG.--A.....T.....-.....AGG.....									
P. llamasiiTA..A.....-.....AAG.....									
P. clarkiiT.TA.-.....T.....T..AG.G.....-.....AG.....T.....TT									

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CH1	AAATAACTGTCTTTTTTGTTTACAAAGATATTTGGTTTAAGGATCCT-AAAAATGGATTATAAGATTAAGTTACTTTAGGGATAACAGCGTAATTTTCTT									
Cu1-.....-									
TL1T.....-									
NE2GT.....-									
Ra2GT.....-									
At2CGGGT.....-..G.....									
LR1CGGGT.....-..G.....									
PM1GGGT.....A.....									
LL3A.A.....G.G.....T.....-.....C.....									
P. sbordoniiGT.....-									
P. llamasiiAG.T.....-..G.....-									
P. clarkiiT.....GT..G.....T.....-.-.G.....-									

	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500

CH1	TAAGAGTTCTTATCGACAGGAAAGTTTGCACCTCGATGTTGAATTAAGTTCTTTATAGAGTAGAGACTATAATAGAAGGTCTGTTTCGACCTTTAAAT									
Cu1									
TL1									
NE2									
Ra2									
At2									
LR1									
PM1									
LL3									
P. sbordonii									
P. llamasii									
P. clarkii									

	510	520	530

CH1	TTTTACATGATTTGAGTTCAGACCGGCGTGAG		
Cu1		
TL1		
NE2	..G.....A.....		
Ra2	..G.....A.....		
At2		
LR1		
PM1		
LL3		
P. sbordonii		
P. llamasii	-----		
P. clarkii		

APÉNDICE 2

Tabla de localidades e individuos con los genes logrados para cada uno. Alineado √, no amplificado –

Localidad	Gen		
	COI	16S ADNr	28S ADNr
Arroyo Palo Pique	1	√	-
	2	√	√
	3	√	-
	4	√	√
	5	√	-
El Sabinal	1	√	√
	2	√	-
	3	√	-
Laguna El Carrizal	1	√	√
	2	√	√
	3	√	-
	4	√	√
	5	√	-
Arroyo El Chile, Sn Antonio Tzujulá	2	√	√
	3	√	√
	4	√	√
	5	√	-
	5	√	-
Charco cerca de la Laguna El Carrizal	1	√	√
	2	√	√
	3	-	√
	4	√	√
	5	√	√
Poza de agua Comitán-La Trinitaria	6	-	√
	7	-	√
	8	√	√
	9	√	√
	1	√	√
Arroyo Veinte Casas	1	√	√
	2	√	√
	3	-	√
	4	√	√
Río La Venta	1	√	√
	2	√	-
	3	-	√
Nuevo San Juan Chamula	1	√	-
	2	√	√
	3	√	√
	4	√	√
Arroyo Tierra y Libertad	4	√	√
	5	√	√
	6	√	√

Localidad	Gen		
	COI	16S ADNr	28S ADNr
Arroyo Villa de las Rosas-Comitán	1	√	√
	2	√	√
	3	√	-
	4	√	-
	5	√	√
Arroyo en Rayón	1	√	√
	2	√	√
	3	√	√
	4	√	-
	5	-	√
Manantial "Nuevo Edén"	1	√	√
	2	√	√
	3	√	√
	4	√	-
	5	√	√
Sótano de La Lucha	3	√	√
	4	√	√
	5	√	√
	5	√	√
	5	√	√
Arroyo de Cerro Hueco	1	√	√
	2	√	√
	3	√	√
	4	√	√
	5	√	√
Sumidero del Higo	1	√	√
	2	√	√
	3	√	√
Cueva de Cuauhtémoc	1	√	√
	2	√	√
	3	√	√
	4	√	√
El Aguajón	1	√	√
	2	√	√
	3	√	√
<i>P. (S.) clarkii</i>	1	√	√
<i>P. (A.) sbordonii</i>	1	√	√
	2	√	√
	3	√	-
<i>P. (A.) llamasi</i>	1	√	√

APÉNDICE 3

Mapeo de los caracteres en el árbol de los 3 genes concatenado. El número y las iniciales en guinda indica las espinas en el caparazón: lt- laterales y bq- branquiostegales. Las fotos son la vista lateral de la región apical del primer pleópodo del macho forma I.

